RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVIII - N. 3 - Luglio 1957

ENTAMOEBA INVADENS RODHAIN, 1934, ED *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* SCHAUDINN, 1903; STUDIO COMPARATO DELLA SENSIBILITA' IN VITRO A 16 FARMACI, E PROBLEMI CONNESSI CON L'USO DELLA PRIMA COME MODELLO PER RICERCHE DI CHEMIOTERAPIA DELL'AMEBIASI

IVO DE CARNERI (*)

Dopo la forte diminuzione dei casi di malaria (RUSSELL, 1956), dovuta sopratutto alla lotta contro gli insetti vettori, l'amebiasi, infezione da parassiti monoxeni, e perciò a diffusione cosmopolita, resta il maggior problema ancora aperto nel campo della lotta contro le malattie da protozoi.

Qualche recente segnalazione pone in discussione la fino ad oggi presunta innocuità di altri rizopodi, parassiti non infrequenti dell'intestino umano, appartenenti a generi diversi della famiglia *Amoebidae* Doflein (REICHENOW, 1953), quali *Iodamoeba bütschlii* Prowazek (DERRICK, 1948) o *Dientamoeba fragilis* Jepps et Dobell (WENRICH, 1944; YOELI, 1955; BURROWS e coll., 1954); tuttavia l'agente dell'amebiasi intestinale ed extra-intestinale dell'uomo è identificato in *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (1).

Secondo BELTRÀN (1948), che si basa sui risultati dell'esame di più di 350.000 individui di 43 paesi, il 12% degli abitanti il continente Americano, il 10% degli Europei, il 16% degli Asiatici e il 17% degli Africani sono parassitati

---

(*) *Istituto d'Igiene e Microbiologia, Università di Pavia,* e *Istituto Carlo Erba per Ricerche Terapeutiche, Milano.* (Direttore: Prof. L. CHECCACCI).

(1) La Commissione internazionale per la nomenclatura zoologica, con deliberazione n. 312, ha recentemente fissato per l'ameba dissenterica dell'uomo il nome di *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, confermando così l'appartenenza di questa e di *E. coli* (Lösch) emend. Schaudinn al genere *Entamoeba* Casagrandi et Barbagallo, 1895, e prescrivendo l'abbandono della grafia *Endamoeba* finora usata dagli Autori americani, che ritenevano poter far rientrare le suddette amebe nel genere *Endamoeba* Leidy, di cui la specie tipo è *Endamoeba blattae* Bütschli. (Vedi: Opinions of the international commission on zoological nomenclature concerning the genera «*Plasmodium*» and «*Entamoeba*». *J. Protozool.*, 1955, 51-53).

da *E. histolytica;* in totale circa il 13% dell'Umanità. Dall'esame di 113 rapporti pubblicati dopo il 1938, tabulati da ANDERSON e coll. (1953), questi dati risultano sostanzialmente confermati.

La gravità dell'infezione varia grandemente da paese a paese, presentando frequentemente in taluni, come in Sud Africa, il quadro di una dissenteria acuta fulminante (ELSDON-DEW, 1949); in altri, ad es. in Inghilterra, caratterizzandosi per una incidenza estremamente bassa di disturbi intestinali ed epatici (ADAMS, 1956).

In base a queste constatazioni un parassitologo come BRUMPT (1925 - 1949), stima che con *E. histolytica,* e sopratutto con la sua forma «minuta», transitoriamente assunta nei periodi di moltiplicazione extra-tissulare nel lume intestinale (REICHENOW, in: FISCHER e REICHENOW, 1952), si confondano spesso altre specie di amebe morfologicamente identiche o difficilmente distinguibili, quali *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, o *Entamoeba hartmanni* Prowazek 1912, non patogene, da considerarsi ospiti innocui e forse (come *Entamoeba coli*), utili dell'intestino umano. Anche HOARE (1949-1950) e WOODRUFF (1956), pur dissentendo sull'esistenza di *E. dispar,* ammettono l'esistenza di una razza nana non patogena, *Entamoeba histolytica hartmanni.*

Queste opinioni non sono condivise da REICHENOW (1953) che è contrario alla distinzione di nuove specie in base ai soli criteri di patogenicità, tra organismi morfologicamente indistinguibili, dei quali non è possibile studiare l'interfecondità, perchè non si moltiplicano per via sessuale (vedi d'altro canto il concetto di razza e specie biologica tra i protozoi in HOARE, 1952). REICHENOW mette anche in evidenza come le dimensioni delle cisti e dei trofozoiti di un ceppo di *E. histolytica* possano variare, passando ad esempio questi ultimi da 6-20 μ a 20-30 μ e viceversa; inoltre ceppi innocui per lunghi periodi di tempo per alcuni portatori sono risultati patogeni in un secondo tempo per gli stessi o per altri individui (vedi anche WESTPHAL, 1937 e 1948).

Anche ANDERSON (1953) e in generale tutta la scuola americana (PATERSON, 1935; CRAIG, 1944) sono del parere che tutti i ceppi di *E. histolytica* sono sempre, di fatto o potenzialmente, patogeni per i portatori. FAUST (1954) conclude che la grande maggioranza dei portatori non affetti da forme cliniche di amebiasi sono soggetti non ad infezioni «asintomatiche» ma «asindromiche»; *E. histolytica* sarebbe essenzialmente un parassita intra-tissulare, moltiplicantesi in microscopiche ulcere alla superficie della parete intestinale del portatore «sano», ulcere continuamente riparate dall'organismo parassitato. Disturbi di vario genere, mancanza d'appetito, nausea, nevralgie, fatica mentale, facile faticabilità, malessere generale, farebbero del portatore di *E. histolytica* un individuo minorato, sempre esposto ad improvvise complicazioni intestinali ed epatiche.

Di fronte alla gravità di questo problema, che interessa sotto un aspetto sanitario e sociale centinaia di milioni di persone, non è meraviglia che nel

dopo guerra si siano moltiplicati gli sforzi per la messa a punto di adeguati mezzi terapeutici. Oltre alle generiche misure igieniche che possono limitare la dispersione delle cisti, ed il loro ingresso nel canale alimentare di nuovi ospiti, le ricerche di chemioterapia, trascurando in parte il problema dei cisticidi (vedi bibliografia di ANDERSON e HANSEN, 1950; PORTER, 1953), si sono concentrate sullo studio di farmaci attivi sui trofozoiti nel lume intestinale, nelle pareti intestinali e nel fegato dell'uomo.

Nella messa a punto di questi farmaci, l'ultimo passaggio prima della sperimentazione sull'uomo è rappresentato da studi di terapia dell'amebiasi sperimentale indotta in animali da laboratorio.

Si utilizzano di preferenza piccoli animali, come ratti (JONES, 1946; FELSENFELD e coll., 1951; MCCOWEN e LAWLIS, 1950; THOMPSON, 1955; NEAL e VINCENT, 1955; LYNCH e coll., 1956) e cavie (TAYLOR e GREENBERG, 1952; MCCOWEN e coll., 1954; LYNCH e coll., 1954 - 55). Si usano però anche cani (THOMPSON e LILLIGREN, 1949), conigli (LUTTERMOSER e coll., 1952) e scimmie (ANDERSON e coll., 1947). I gattini (CLAMPIT, 1948) non vengono più usati. L'hamster dorato è particolarmente adatto per gli studi di chemioterapia dell'amebiasi epatica (THOMPSON e REINERTSON, 1951).

A queste prove in vivo alquanto laboriose, vengono generalmente ammesse solo sostanze che superano una selezione preliminare basata sull'attività esplicata su trofozoiti di *E. histolytica* in cultura. Gli studi in questo senso sono però complicati dal fatto che questa ameba cresce in vitro solo in presenza di batteri, o di protozoi flagellati della famiglia *Trypanosomidae* (PHILLIPS, 1951). Questi batteri e protozoi cobionti forniscono metaboliti essenziali non ancora identificati, ed assicurano nel terreno di cultura bassi valori del potenziale di ossido - riduzione, indispensabili alla vita di *E. histolytica*.

Perciò ogni sostanza che inibisca lo sviluppo dei microorganismi associati presenta in vitro un fittizia attività su *E. histolytica*. Dopo i primi deludenti risultati (PYMAN, 1937; vedi in proposito GOODWIN, 1948; ANDERSON e HANSEN, 1950) le precauzioni e gli accorgimenti per evitare questa difficoltà si sono moltiplicati in modo tale, che le tecniche di studio sono attualmente numerose e quindi difficilmente comparabili.

Si eseguono determinazioni in terreni bifasici (SENECA, 1954; MÜHLPFORDT e MARTINEZ - SILVA, 1956) o monofasici (BALAMUTH, 1953; MCCOWEN e coll., 1954) senza e con proteine (THOMPSON e coll., 1955); in terreni « precondizionati » dai batteri, che vengono poi allontanati per centrifugazione (SHAFFER e BIEGELEISEN, 1951) o in terreni in cui la crescita dei batteri è contemporanea a quella delle amebe, o la precede (BALAMUTH, 1953); in presenza di un solo ceppo batterico (BRACKETT e BLIZNICK, 1947; BALAMUTH e BRENT, 1950; LYNCH e coll., 1954); o di una flora batterica mista non identificata (JONES, 1952; LYNCH e coll., 1956); in presenza di *Trypanosoma cruzi* (NAKAMURA e ANDERSON, 1951).

Anche il grado di anaerobi (THOMPSON e coll., 1950; ANDERSON e HANSEN,

1950; de CARNERI, 1956), l'entità e l'età della semina, la durata del periodo d'incubazione, e la valutazione dei risultati in base ad una inibizione totale o parziale — ad esempio DL_{50} — della popolazione amebica (ANDERSON e HANSEN, 1950; PHILLIPS, 1951; HANSEN e BENNETT, 1952; BALAMUTH, 1955; DE CARNERI, 1957) variano secondo gli autori. Vedi tabella 1).

I pareri sono discordi sull'efficacia di queste prove in vitro, alcuni ritenendole significative (BALAMUTH, 1955), altri solo indicative (LYNCH e coll., 1956), altri invece spesso mendaci (THOMPSON e coll., 1956).

E' probabile che alcuni dei metodi usati, sopratutto quelli che utilizzano terreni già «bonificati» da un'abbondante crescita batterica (siano o no i batteri a questo punto allontanati) diano dei risultati perfettamente attendibili di azione antiamebica diretta. E' stato infatti dimostrato che *E. histolytica* cresce bene in terreni contenenti solo germi già morti (JACOBS, 1947) e solo i prodotti del metabolismo batterico (SHAFFER e FRYE, 1948).

Dall'esame della letteratura risulta però che nonostante tutto perdura su questo argomento uno stato di dubbio, per cui un fallimento delle prime prove antiamebiche in vivo su animali, dopo favorevoli prove in vitro, viene generalmente attribuito all'inattendibilità di queste.

La causa di tali discordanze risiede invece talvolta nelle caratteristiche farmacologiche della sostanza in esame, inattivata ad esempio o assorbita nella prima parte dell'intestino, sì da giungere in quantità insufficiente nell'ultima parte, sede dell'infezione. La clorochina ha un comportamento di questo genere, per ovviare a questo inconveniente, nell'amebiasi intestinale viene ora proficuamente somministrata sotto forma di una combinazione chimica poco assorbibile (PFANNEMÜLLER, 1956).

A causa di simili equivoci è possibile che lo studio di qualche struttura chimica promettente, venga troppo presto abbandonato.

Queste ricerche in vitro sono d'altronde, allo stato attuale delle cose, insostituibili, come prova la loro progressiva diffusione nei laboratori delle industrie farmaceutiche, dove decine di migliaia di composti sono stati saggiati, e dove lo studio dell'eventuale azione antibiotica dei brodi di fermentazione di nuovi ceppi di muffe non può prescindere da queste prime indicazioni.

Per superare le difficoltà connesse con l'esistenza di un'azione indiretta che si esplica attraverso l'inibizione dei microorganismi che condizionano la crescita in vitro di *E. histolytica*, vi è la possibilità di ricorrere, per la determinazione dell'attività antiamebica dei farmaci in vitro, a qualche altra razza di amebe, di più facile coltivabilità, che non richieda per crescere la presenza di altri microorganismi, e che da un punto di vista morfologico e biologico differisca il meno possibile da *E. histolytica*.

Nelle ricerche di chemioterapia il ricorso a sottospecie o varietà come «modelli» è frequente, e spesso si è dimostrato proficuo: si può citare in campo batteriologico il *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 607 (DE CARNERI e FACHI-

NELLI, 1954) il *Mycobacterium leprae murium* (MUDROV-REICHENOW, 1954); in campo elmintologico *Hymenolepis nana* var. *fraterna* (STEWARD, 1955) e *Ascaris lumbricoides* (*Ascaris suilla*) dei suini (KANEKO e coll., 1955).

Meno giustificato in campo protozoologico, e precisamente nella ricerca di farmaci antiamebici, appare il ricorso a *Entamoeba criceti*, ospite innocuo del lume intestinale dell'hamster, caratterizzato da cisti ad 8 nuclei, e più simile ad *Entamoeba muris* (GRASSI, 1879) e a *Entamoeba coli* (Lösch) emend. Schaudinn che non ad *E. histolytica* (DENNIS e coll., 1949; vedi FULTON e JOYNER, 1948).

Altrettanto si può dire dell'utilizzazione di *Amoeba proteus*, forma a vita libera, non parassita, appartenente ad un'altra famiglia dell'ordine *Amoebina* Ehrenberg (BAKHSH, 1936).

Se ci si limita al genere *Entamoeba*, la specie — o secondo altri sottospecie — che per vari motivi si rivela più adatta allo scopo è *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934.

Questo rizopode è secondo GEIMAN e RATCLIFFE (1936) indistinguibile morfologicamente da *E. histolytica*, a parte una maggiore densità citoplasmatica ed una membrana cistica più robusta.

Le cisti tetranucleate, e le fasi metacistiche, di incistazione ed excistazione, sono identiche nelle due amebe.

Differisce solo il rapporto nucleocitoplasmatico, che è alquanto superiore in *E. invadens* (0,295) che in *E. histolytica* (0,246).

MCCONNACHIE (1955) considera insignificanti le differenze morfologiche, e solo in base a differenze ecologiche e fisiologiche ammette la distinzione di una sottospecie, da chiamarsi *Entamoeba histolytica invadens*.

BAUD e BORER invece (1952), in base a misure di birifrangenza del citoplasma e in base ad alcune osservazioni sulla struttura della mebrana nucleare fatte da RODHAIN (1934), propendono per assegnare a questa ameba la dignità di specie. RAY e coll. (1955) con osservazioni citochimiche, e HOARE (1955) in base a criteri ecologici rafforzano questa opinione.

E. invadens è stata isolata da varie specie di serpenti (RATCLIFFE e GEIMAN, 1933, 1934, 1938; GEIMAN e RATCLIFFE, 1936; RODHAIN, 1934; HILL e NEAL, 1954), nei quali provoca gravissime lesioni amebiche che dall'intestino si generalizzano a tutti i tessuti, provocando una setticemia mortale.

Anche varie lucertole e varani sono sensibili; alligatori, rane, mammiferi, non sono recettivi all'infezione (RATCLIFFE e GEIMAN, 1938; RODHAIN e VAN HOFF, 1934, 1935, 1937; BRUMPT, 1939).

E' stato però segnalato (MEEROVITCH, 1955) che nell'embrione di pollo *E. invadens* provoca tipici ascessi epatici.

Queste differenze ecologiche tra *E. invadens* ed *E. histolytica* trovano corrispondenza in differenze fisiologiche. Secondo MCCONNACHIE (1955) la prima può svilupparsi tra 16° C. e 35° C., con un optimum tra i 24° C. e i 30° C. *E. hi-*

stolytica invece (Boeck e Drbohlav, 1925; Dobell e Laidlaw, 1926) si sviluppa tra 30° C. e 41° C., con optimum tra 37° C. e 38° C.

Lo sviluppo della prima è lento e la vitalità in cultura lunga (fino a 70 giorni), mentre che le culture di *E. histolytica*, anche per lo sviluppo più rapido dei batteri cobionti a 37° C., raramente raggiungono la durata di 8 giorni.

Sono state segnalate molte altre specie di amebe a cisti a 4 ed a 8 nuclei, parassite dei vertebrati e degli invertebrati; a parte le infezioni naturali da *E. histolytica* in scimmie, cani, ratti e altri animali, sono state segnalate numerose amebe a cisti tetranucleate, come *Entamoeba equi*, *E. lagopodis*, della pernice bianca (Reichenow, 1952), *E. ranarum* Grassi, 1879 (Sanders, 1931), *E. aulastomi* Nöller (Bishop, 1937), isolata dall'intestino di una sanguisuga, *E. moshkovskii* Tshalaia, 1941 (Neal, 1953), forma a vita libera, potenziale parassita, capace di fagocitare eritrociti di mammiferi (Pizzi, 1956), tutte morfologicamente assai simili ad *E. histolytica* ed *E. invadens*. Anche i trofozoiti di *E. gingivalis* Gros, 1849, diffusissimo parassita della bocca dell'uomo (de Carneri, 1957 b), senza forme cistiche, sono difficilmente distinguibili da quelli di *E. histolytica* (Westphal, 1941).

Se si eccettua però una segnalazione di Ilowaisky (1922) che trovò che *Rana temporaria* è frequentemente soggetta ad ascessi amebici epatici, *E. invadens* si distingue dalle altre per un elevatissimo potere patogeno, e per la tendenza a trasformarsi nell'ospite da parassita del lume intestinale in un parassita intratissulare.

Questo, in base ad una certa analogia, può essere un argomento di preferenza nella scelta di un «modello» per la ricerca in vitro di farmaci attivi su *E. histolytica*.

La sua coltivazione, come quella di tutte le specie di *Entamoeba* degli animali a sangue freddo, è assai più semplice di quella di *E. histolytica*. Secondo Reichenow (1953) si moltiplica — in presenza di batteri — nel terreno di Barret e Smith (1926), soluzione al 5% di NaCl addizionata del 10% di siero umano inattivato.

Recentemente tre autori (Lamy, 1948a e 1948b; Miller, 1951 e 1953; Mc Connachie, 1956) hanno comunicato di aver conseguito la cultura di *E. invadens*, in assenza di altri microorganismi, in terreni contenenti fegato di pollo, ratto, hamster, o di altri animali.

Finora non sono stati eseguiti dei confronti tra l'attività esplicata in vitro dai farmaci antiamebici già noti su *E. histolytica* in presenza di batteri, e su *E. invadens* in cultura pura; ma non vi è dubbio che, appena le tecniche relative si saranno diffuse, si procederà agli opportuni confronti onde stabilire se esista o meno una corrispondenza tra la sensibilità ai farmaci delle due amebe.

Mancano anche dati di sensibilità ai farmaci di *E. invadens* coltivata, come *E. histolytica*, in presenza di batteri. La letteratura riporta solo un lavoro

presente [illegible] dell'ATTILIANI (1956) che ha determinato su simili colture l'attività dell'emetina e di tre chinoleine.

Nel presente lavoro, di carattere preliminare, viene presa in considerazione l'attività di diversi chemioterapici ed antibiotici su di un ceppo di E. invadens coltivato in presenza di flora batterica mista, come essa risulta da ripetuti esami microscopici eseguiti dopo vari periodi di incubazione.

Le stesse sostanze sono già state saggiate con tecniche analoghe nella loro azione su qualche ceppo di E. histolytica, associati a flora batterica mista.

PARTE SPERIMENTALE.

Il ceppo di E. invadens, associato a flora batterica mista, mi fu gentilmente fornito dal Dr. A. WESTPHAL del Tropen Institut di Amburgo, e viene conservato in terreno di Pavlova (vedi sotto) mediante passaggi settimanali alla temperatura di 25°C.

Su questo ceppo fu determinata l'attività delle seguenti sostanze: yatren, carbarsone, clorochina, primachina, diiodossichinolina, penicillina, bacitracina, eritromicina, clorotetraciclina (aureomicina), ossitetraciclina (terramicina), tetraciclina, D(-) treo-cloramfenicolo, L(+) treo-cloramfenicolo, neomicina, emetina, fumagillina. Esse furono sciolte o sospese finemente, e poi diluite, in progressione geometrica di ragione 2, in provette da batteriologia contenenti 2 cc. di terreno di Pavlova (1938) modificato da Jones (1946), della seguente composizione: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ gr. 4,45 — KH_2PO_4 gr. 1,35 — NaCl gr. 20 — estratto lievito Difco gr. 2,75 — H_2O dist. cc. 2750 — pH 7,2. Si sterilizza 20' a 115°C. Al momento dell'uso si aggiunge il 5% di siero di cavallo sterile e una punta di spatola di polvere di riso Difco sterilizzata 1 ora a 160°.

Sebbene esista il pericolo che qualche sostanza in esame possa legarsi con le proteine del siero ([illegible] e coll., 1954) con conseguente diminuzione dell'attività, terreni come questo e addizionati di amebe ([illegible] e coll., 1955) offrono rispetto ad altri terreni senza proteine (BALAMUTH, 1946) condizioni di esperimento più vicine a quelle esistenti nell'ambiente intestinale o epatico.

Ai 2 cc. delle diluizioni delle sostanze in esame, contenenti già una sospensione di polvere di riso, si aggiungono 2 cc. di una sospensione di E. invadens coltivata per 6 giorni a 25°C. in bottiglie di Roux da lt. 1, contenenti 200 cc. dello stesso terreno.

Le amebe nei 2 cc. sono circa 200.000 (conteggio in camera di Bürker) ed i batteri associati circa 4 miliardi (conteggio secondo il roll tube method di Wilson, 1922). Si agita bene e si pone ad incubare a 25°C. per 14 giorni, allo scadere dei quali le amebe in ogni provetta di controllo sono circa 800.000.

E' importante che tutte le provette da batteriologia in cui si eseguono i dosaggi abbiano identiche dimensioni (ad es. 150/15 mm.) poichè è stato messo in evidenza ([illegible], 1950) che il numero di amebe in una coltura matura dipende, entro certi limiti, più dall'area del fondo del recipiente in cui le amebe si sviluppano che non dal volume del liquido di coltura. Ciò, oltre che per E. histolytica, è, a mia esperienza, valido anche per E. invadens.

Dopo 15' — 30' — 60' — 90' — 2h — 3h — 4h 30' — 6h — 7h 30' — 9h — 16h — 24h — 30h — 40h — 48h — 64h — 72h — 4gg. — 5-6-7-8-9-10-11-12-13-14 giorni di incubazione, si eseguono letture al microscopio, a 125 e 500 ingrandimenti, prelevando per l'esame una piccola quantità del sedimento mediante una pipetta capillare, senza agitare. L'esame è considerato negativo quando nel campione prelevato, disposto su un vetrino porta-oggetti, coperto con coprioggetti e accuratamente esaminato, non vi è alcuna ameba che dimostri, per l'aspetto del citoplasma e segnatamente per la capacità di emettere pseudopodi, di essere viva.

La distinzione delle amebe già morte da quelle solo paralizzate è facilitata anche dal fatto che le prime degenerano rapidamente per autolisi, e per l'attività della flora batterica, o di sistemi enzimatici da essa liberati.

Non occorre che il microscopio sia dotato di tavolino riscaldato. E' importante che l'esame venga eseguito da personale esercitato. Se non si notano amebe vive, l'esame è esteso a tutto il sedimento; poichè la prova è eseguita in doppio, l'attività di una sostanza dopo un dato tempo per una data concentrazione viene stabilita dopo che l'esame è stato esteso anche alla provetta gemella. Se in una delle due provette è presente anche una sola ameba, la sostanza è considerata inattiva a quella concentrazione. Le determinazioni definitive furono precedute da prove orientative; nei casi più interessanti le prove furono ripetute più volte. La concordanza fra le varie prove fu in generale buona, nei limiti della variabilità riscontrata da altri ricercatori (BALAMUTH e THOMPSON, 1955). Nelle tabelle allegate vengono riportati per ogni sostanza i dati relativi ad una sola determinazione, di solito eseguita in parallelo con altre sostanze partendo dallo stesso lotto di semina.

Si utilizza così per la misura dell'attività la dose sterilizzante, e non dosi che provocano effetti parziali, ad es. la DL 50. Infatti secondo ANDERSON (1950) ed anche secondo nostre esperienze, le curve probit di amebicidia costruite secondo MILLER e TAINTER (1944) possono avere pendenze assai varie.

Le sostanze dotate di azione antiamebica diretta non presentano in generale forte differenza tra la DL 50 e la dose sterilizzante, mentre in presenza di alcuni composti che agiscono prevalentemente sulla flora batterica concomitante, qualche ameba sopravvive anche a concentrazioni 10 volte superiori alla DL 50.

In queste condizioni la determinazione della DL 50 proposta da BALAMUTH (1955) non dà nessuna idea della efficacia terapeutica dei farmaci, che vanno somministrati in dosi tali da sradicare completamente l'infezione amebica.

Le amebe infatti, come gli altri protozoi e batteri parassiti dell'uomo, e a differenza degli elminti (se si accettui il caso particolare dello *Strongyloides stercoralis*) si moltiplicano nell'organismo parassitato; la terapia, per essere efficace, deve perciò tendere ad una sterilizzazione totale.

In condizioni simili a quelle sopra descritte (DE CARNERI, 1957) furono determinate le sensibilità alle stesse sostanze di quattro ceppi di *Entamoeba histolytica*, EdM, F22, Meah e VI, gentilmente forniti dal Prof. LAMY, dell'Institut Pasteur di Parigi, dal prof. BUONONIMI dell'Università di Pisa ,dal Dr. RYLEY, dell'Imperial Chemical Ltd., Manchester, e dal Dr. WESTPHAL del Tropen Institut di Amburgo. Questi ceppi, associati a flora batterica mista, vengono coltivati a 37°C. in terreno di Pavlova, e passati 2 volte alla settimana.

Le determinazioni microscopiche dell'attività su *E. histolytica* furono eseguite tra 15' e 72h. e non oltre, perchè a questo punto qualche ceppo, il Meah soprattutto, mostrava già nelle provette di controllo segni in invecchiamento.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono schematizzati alcuni metodi usati da vari autori per la determinazione dell'attività antiamebica dei farmaci in vitro. Nella tabella 2 sono riportati i livelli di attività di sedici sostanze su 4 ceppi di *Entamoeba histolytica*, dopo vari tempi di osservazione, secondo quanto è già stato descritto; nella tabella 3 sono riassunti i dati riguardanti l'attività delle stesse sostanze su *Entamoeba invadens*.

Yatren. L'attività dello Yatren su *E. histolytica* e su *E. invadens* è pres-

TABELLA 1

Alcuni metodi usati per determinare l'attività « in vitro » dei farmaci su E. histolytica.

TERRENO	Incubazione a 37° ore	Associazione	Inoculo Trofozoiti	Anaerobiosi	Valutazione risultati	Autori
Monofasico	96	Polibatterica	?	———	Amebicidia	JONES, 1952
Monofasico	48	*T. cruzi*	300.000	Petrolatum	Amebicidia	NAKAMURA e ANDERSON, 1951
Monofasico	72	*T. cruzi*	1	?	Amebicidia	PHILLIPS, 1951
Monofasico	24-48	Polibatterica	150.000	CO_2	Semiquantitativa	THOMPSON e coll., 1956
Monofasico	5-24-48	Monobatterica	21000-336000	—, e CO_2	Quantitativa	HANSEN e BENNET, 1952
Bifasico	48-72	Monobatterica	50.000	———	Amebicidia	LYNCH e coll., 1954
Monofasico 1)	48	Polibatterica	40-50.000	———	Amebicidia	McCOWEN e coll., 1954
2)	72	Monobatterica centrifugata	1.000	?	»	» » »
Bifasico (rinnovo fase liquida e amido riso)	24-336	Polibatterica	?	———	Semiquantitativa	MÜHLPFORDT e MARTINEZ-SILVA, 1956
Bifasico	24-48	Monobatterica	50.000	———	Amebicidia	SENECA, 1954
Monofasico	48-72	Monobatterica e polibatterica	> 100.000	———	Amebicidia	BALAMUTH e BRENT, 1950
Bifasico	96-120	Monobatterica	500	———	Amebicidia	BRACKETT e BLIZNICK, 1947
Monofasico	48	Monobatterica centrifugata	?	Vaselina	Semiquantitativa	SHAFFER e BIEGELEISEN, 1951.

sapoco corrispondente: dopo 72h. a 37° C. è tra i 250 e i 1000 μg/cc. sui vari ceppi della prima, e di 500 μg/cc. dopo 4 giorni a 26° C. sulla seconda. Quantunque su 3 ceppi di *E. histolytica* l'attività inizi a manifestarsi più precocemente, tra 90' e 6h., sul ceppo Meah essa inizia più tardi (16h.) che non su *E. invadens* (2000 μ g/cc. dopo 9h.).

Carbarsone. L'attività su *E. invadens* è più lenta e più debole che non su *E. histolytica*, stabilizzandosi dopo 24h. su 2000 μg/cc.; tuttavia sul ceppo F22 della seconda, che appare più resistente degli altri, è attivo a 2000 μ g/cc. solo dopo 30h., e si stabilizza sui 1000 μg/cc. dopo 40h.

Clorochina e pirimetamina. Come su *E. histolytica,* anche su *E. invadens* il secondo di questi due chemioterapici antimalarici ha un'azione più rapida e più marcata del primo. L'attività della pirimetamina su *E. invadens* è di 2000 μg/cc. dopo 30' e si stabilizza sui 1000 μg/cc. dopo 30h.; i 4 ceppi di *E. histolytica* presentano una gamma assai varia di sensibilità, forte nel ceppo VI (250 μg/cc. dopo 48h.) debole nel ceppo Meah (si stabilizza sui 2000μ g/cc dopo 6h.).

L'attività della clorochina su *E. invadens* è compresa, per velocità ed entità, tra quella sul ceppo F22 e quella sul ceppo Meah (poco sensibile) di *E. histolytica.*

Antibiotici antibatterici. Vi è una buona corrispondenza tra le sensibilità delle due specie di amebe a questi antibiotici. Su entrambe la diidrostreptomicina è inattiva anche a concentrazioni del 2%. La penicillina è inattiva a 20.000 μ g/cc. su F22; è attiva a 20.000 μ g/cc. dopo 40h. su altri 2 ceppi di *E. histolytica,* e dopo 64h. a 10.000μ g/cc. sul ceppo Meah; su *E. invadens* l'attività si stabilizza dopo 72h. sui 20.000 μ g/cc.

Il ceppo di *E. histolytica* più sensibile alla bacitracina è F22, che dopo 2h. è eliminato dalle provette contenenti 20.000 μ g/cc., e dopo 4h. 30' da quelle contenenti 10.000 μg/cc.; dopo 16h. 3 ceppi sono sensibili a 10.000 μ g/cc. mentre sul ceppo VI l'azione si stabilizza sui 20.000 μ g/cc. L'azione su *E. invadens* si stabilizza dopo 3h. sui 20.000 μ g/cc.

L'attività dell'eritromicina, antibiotico che ha uno spettro antibatterico simile a quello della penicillina, e che desta in questi ultimi tempi molto interesse come antiamebico, si stabilizza su *E. invadens* sui 10.000 μ g/cc. dopo 30'. Sui 4 ceppi di *E. histolytica* inizia a manifestarsi alquanto più tardi (tra 3 e 4,30' ore) e si stabilizza sui 5.000 μ g/cc. dopo 40-48h.

La scarsissima attività antiamebica che questi antibiotici esibiscono in vitro, che contrasta con la buona attività che essi e i sulfamidici hanno in vivo, conferma l'importanza dell'azione patogena concomitante dei batteri nell'amebiasi intestinale (WESTPHAL, 1937; ELLENBERG, 1946; ELSDON-DEW, 1954-1955).

Isomeri ottici del cloramfenicolo. Una interessante conferma della scarsa influenza dell'attività antibatterica dei composti in esame nel corso di queste prove è data dallo studio dell'attività antiamebica dei due treo-cloramfenicoli enantiomorfi.

L'isomero naturale del cloramfenicolo, il D (—) CAF, dotato di forte attività antibatterica, ed il suo antipode ottico, L (+) CAF, sprovvisto di attività antibatterica, presentano su *E. invadens* e sui 4 ceppi di *E. histolytica*, attività antiamebiche non molto diverse. Più precisamente l'attività, su *E. invadens*, pur stabilizzandosi dopo 5 giorni sui 1000 μg/cc. con entrambi gli isomeri, si rivela più precoce con l'L (+) CAF (2000 μg/cc. dopo 24h.) che non con il D (—) CAF batteriologicamente attivo (2000 μg/cc. dopo 4 giorni).

L'attività dei due isomeri su *E. histolytica* è per alcuni ceppi eguale; per altri invece l'isomero D (—) CAF risulta più attivo di un gradino della scala delle diluzioni.

Questi dati che portano ad attribuire al CAF un'attività antiamebica specifica, indipendente dalla configurazione ottica e dall'attività batteriostatica, e legata alla funzione dicloracetamidica (DE CARNERI, 1956) contraddicono l'affermazione di THOMPSON (vedi SMITH e coll., 1948), che in presenza di CAF «il numero di amebe mobili dopo 48h. decresce in maniera proporzionale all'inibizione della flora batterica associata».

Tetracicline. Tra le tetracicline, la clorotetraciclina (aureomicina) si distingue per la rapidità e l'entità dell'azione su entrambe le specie di amebe. Su *E. invadens* l'attività è rapida, ma meno intensa (2000 μg/cc. dopo 30', e 125 μg/cc. dopo 16h. e fino al quattordicesimo giorno) che non sui 4 ceppi di *E. histolytica* (tra 32 e 64 μg/cc. dopo 64h.). La ossitetraciclina (terramicina) è meno attiva sulla prima (250 μ g/cc. dopo 14 giorni) che non sulle seconde (64-125 μg/cc dopo 64h.). La tetraciclina pare avere un'azione alquanto più rapida e notevole su *E. invadens* che non la terramicina: dopo 72h. è attiva a 500 μ g/cc., e dopo 14 giorni a 125 μg/cc. Sui 4 ceppi di *E. histolytica* dopo 72h. l'attività è tra 125 e 250 μ g/cc.

Nel complesso, l'inizio rapido dell'azione delle tetracicline sulle due specie di amebe fa pensare ad un meccanismo di azione diretta, indipendente dall'azione batteriostatica.

Tricomicina. Questo antibiotico polienico è dotato di azione veloce, che si manifesta fra la seconda e la 30ª ora su 3 ceppi di *E. histolytica*, (da 1000 a 8-32 μ g/cc.), e tra la 1ª e la 30ª ora su *E. invadens* (da 1000 a 32 μg/cc.).

Il ceppo VI di *E. histolytica* è particolarmente resistente e solo dopo 64h. è sensibile a 500 μ g/cc. di tricomicina.

Fumagillina ed emetina. L'az one di queste due sostanze di origine naturale sulle culture di *E. histolytica* ha un andamento parallelo. Durante il primo

TABELLA 2.

Attività su 4 ceppi di Entamoeba histolytica *in* γ */cc. dopo progressivi periodi di incubazione a 37°C. in terreno monofasico di Pavlova.* (Vedi dettagli tecnici nel testo).

Sostanze	CEPPO	15'	30'	1h	1h30'	2h	3h	4h30'	6h	7h30'	9h	18h	24h	30h	40h	48h	64h	72h
Yatren	EdM	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500	500	250
	F22	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500
	Meah	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	VI	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	2000	2000	500	500	500	500	250	250
Carbarsone	EdM	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	2000	2000	1000	500	250	250	250
	F22	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	4000	2000	1000	1000	1000	1000
	Meah	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	2000	1000	1000	500	500	500	500	500
	VI	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	2000	1000	1000	1000	1000	500	250	250	250
Clorochina	EdM	>10000	10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	2500	2500	2500	2500	2500	1250	1250
	F22	>10000	5000	2500	2500	2500	1250	1250	1250	1250	1250	625	310	310	310	310	310	310
	Meah	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	10000	5000	5000	5000
	VI	>10000	5000	2500	2500	2500	2500	2500	1250	1250	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625
Pirimetanina	EdM	4000	2000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500	500
	F22	>4000	>4000	4000	4000	4000	4000	2000	2000	1000	500	500	500	500	500	500	250	250
	Meah	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
	VI	>4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	500	250	250	250
Diidrostreptomicina	EdM	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	F22	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	Meah	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	VI	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
Penicillina	EdM	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000
	F22	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
	Meah	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	10000	10000
	VI	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000
Bacitracina	EdM	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
	F22	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
	Meah	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000	20000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
	VI	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
Eritromicina	EdM	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000
	F22	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000	5000
	Meah	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000
	VI	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5000	5000	5000	5000

Sostanze	CEPPO	15'	30'	1h	1h30'	2h	3h	4h30'	6h	7h30'	9h	16h	24h	30h	40h	48h	64h	72h
D (—) treo-clo-ramfenicolo	EdM	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000
	F_{22}	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	1000	500	500
	Meah	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000
	VI	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	500	500	500	500
L (+) treo-clo-ramfenicolo	EdM	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	1000	1000
	F_{22}	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	1000	1000
	Meah	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000
	VI	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000
Clorotetraciclina	EdM	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	125	125	125	64	64	64	64	64	32	32	32
	F_{22}	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	125	125	125	64	64	64	64	64	64	64	64
	Meah	>2000	2000	2000	1000	1000	250	250	125	125	125	125	125	64	64	64	64	64
	VI	>2000	2000	2000	1000	500	500	500	500	500	250	125	125	125	125	125	64	64
Ossitetraciclina	EdM	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	500	500	500	500	250	250	250	250	125	125	125	125
	F_{22}	>4000	>4000	>4000	4000	4000	2000	2000	1000	1000	1000	500	250	250	250	125	64	64
	Meah	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	500	1000	1000	1000	1000	1000	500	250	250	125	125	125
	VI	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	500	125	125	125	64	64
Tetraciclina	EdM	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	500	500	500	500	500	500	125	125	125	125	125
	F_{22}	>4000	>4000	>4000	4000	4000	2000	500	500	500	500	250	250	250	250	250	250	250
	Meah	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	1000	1000	1000	500	500	500	125	125	125	125
	VI	>4000	>4000	>4000	4000	4000	4000	2000	1000	1000	1000	500	500	250	250	250	250	125
Tricomicina	EdM	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	250	250	64	64	32	16	8	8	8	8	8	8
	F_{22}	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	250	125	125	125	64	64	64	32	32	32	32	32
	Meah	>1000	>1000	>1000	>1000	500	125	125	125	64	16	16	16	16	16	16	16	16
	VI	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	500
Emetina	EdM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250	250	3	3	3	3
	F_{22}	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	12,5	12,5	12,5	12,5
	Meah	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	500	25	25	25	25
	VI	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	50	25	12,5	12,5	12,5	12,5
Fumagillina	EdM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	50	25	12,5	12,5
	F_{22}	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	25	12,5	12,5	12,5
	Meah	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	62	12,5	6,3	6,3
	VI	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	62	3	3	3	3

TABELLA 3.

Attività su Entamoeba invadens *in* γ/cc. *dopo progressivi periodi di incubazione a 26°C. in terreno monofasico di Pavlova.* (Vedi dettagli tecnici nel testo).

Sostanze	TEMPO 15'	30'	60'	90'	2h	3h	4h 30'	6h	7h 30'	9h	16h	24h	30h	40h	48h	60h	72h	4gg	5gg	6gg	7gg	10gg	14gg
Yatren	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	4000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500	500	500
Carbarsone	>8000	>8000	>8000	>8000	8000	8000	8000	8000	8000	4000	4000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Clorochina	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Pirimetamina	>2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Diidrostreptomicina	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
Penicillina	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
Bacitracina	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
Eritromicina	>10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
D (—) treo-cloramfenicolo	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000
L (+) treo-cloramfenicolo	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Clorotetraciclina	4000	2000	2000	2000	2000	1000	500	250	250	250	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
Ossitetraciclina	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	4000	2000	2000	2000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500
Tetraciclina	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	4000	2000	2000	2000	2000	1000	1000	500	500	500	500	500	500	500	500	250	250
Tricomicina	>1000	>1000	1000	1000	500	500	500	250	250	125	125	125	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Emetina	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	500	500	500	500	500
Fumagillina	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	50	3	3	3	3

giorno di contatto le amebe si conservano vive anche alle concentrazioni più alte. Si nota solo un intorpidimento dei movimenti. A partire dalla 24ª o 30ª ora (con notevoli oscillazioni nelle varie prove) l'attività si rivela.

La sensibilità dei 4 ceppi alle due sostanze è forte e in generale omogenea (tra 3 e 25 μg/cc.).

Su *E. invadens* la fumagillina ha un comportamento analogo, seppure ritardato. Solo dopo 4 giorni l'attività accenna a manifestarsi; dopo 6 giorni si stabilizza su 3 μ g/cc.

La emetina è invece qui assai poco attiva. L'attività si manifesta tuttavia tra il 4° e il 5° giorno, e si ferma sui 500 μ g/cc.

Conclusione

Il comportamento delle due specie di *Entamoeba* di fronte ai 16 farmaci studiati è assai simile. La maggioranza di queste sostanze agisce più lentamente e ad una diluzione alquanto inferiore su *E. invadens* rispetto ad *E. histolytica*. Tuttavia le differenze di sensibilità ai singoli farmaci sono, tra i 4 ceppi della seconda, abbastanza ampie per porre spesso alla pari la sensibilità di *E. invadens* con quella del ceppo di *E. histolytica* di volta in volta meno sensibile.

La maggior lentezza dell'azione su *E. invadens* può essere una conseguenza della temperatura più bassa (26°C) che fu scelta per le prove con questo parassita dei rettili, e si collega con la lentezza dello sviluppo e con la maggior durata delle culture, rispetto a quelle di *E. histolytica,* di cui si è già parlato.

Il comportamento di fronte all'emetina e alla fumagillina è, sotto questo aspetto, caratteristico. Il modo d'azione è qui assai diverso da quello della tricomicina, caratterizzata da una rapida azione litica aspecifica su entrambe le specie di amebe, ed anche su varie specie di tricomonas (DE CARNERI, dati non pubblicati). E' presumibile che emetina e fumagillina si inseriscano in catene di reazioni biochimiche alquanto lunghe, provocando la morte di questi rizopodi dopo un tempo proporzionale alla velocità del loro metabolismo. Esse rivelano la loro attività su *E. histolytica* dopo un periodo di incubazione che va da 24 a 30-40 ore, e su *E. invadens* dopo 4-6 giorni.

Anche sotto questo aspetto farmacologico si confermano dunque le somiglianze fondamentali tra queste due amebe, ed allo stesso tempo le differenze legate all'adattamento dei due protozoi a due diversi ambienti ecologici.

Appare quindi giustificato l'uso di *E. invadens* quale modello per lo studio in vitro dell'attività antiamebica di nuove sostanze, qualora la semplicità dei terreni utilizzabili con questo ceppo elimini la bardatura di precauzioni che intralcia i dosaggi con *E. histolytica;* a questo scopo sembra innanzitutto necessaria la ricerca di nuovi terreni che permettano la cultura di *E. invadens* oltre che in assenza di batteri anche in assenza di fettine di tessuto epatico.

Un lato negativo è quello della lentezza dei metodi che si basino su *E. invadens*. La lettura dei risultati può essere utilmente eseguita dopo 48h. con *E. histolytica;* per mettere in evidenza l'attività di sostanze come la fumagillina, l'esame dello stato delle culture di *E. invadens* deve essere invece eseguito dopo 6 giorni di incubazione.

Per le prove in vivo appare invece ingiustificata la proposta di MILLER (1953) di utilizzare l'infezione amebica dei serpenti, quando con ceppi virulenti di *E. histolytica* si può conseguire l'infezione amebica intestinale ed epatica dei comuni animali da laboratorio.

RINGRAZIAMENTI — Ringrazio la Ditta Upjohn, Kalamazoo, U.S.A., che mi fornì cortesemente la fumagillina.

Ringrazio inoltre le Sig.ne BISOGNI VITTORIANGELA e MONTI GISELLA per l'aiuto tecnico prestato.

RIASSUNTO

E' stata studiata l'azione in vitro di 16 antibiotici e chemioterapici su *E. invadens*.

Le culture in terreno monofasico, poste a contatto con le suddette sostanze, ed incubate a 26° C., sono state ripetutamente esaminate al microscopio tra 15' e 14 giorni.

I risultati vengono paragonati con quelli ottenuti in condizioni simili, con 4 ceppi di *E. histolytica*, incubati a 37° C. per 3 giorni. Nella discussione dei risultati si pone in evidenza la fondamentale analogia di comportamento delle due specie.

Su entrambe alcuni antibiotici antibatterici (diidrostreptomicina, penicillina, bacitracina) sono risultati sprovvisti di apprezzabile attività antiamebica. Anche l'eritromicina ha in vitro scarsa attività.

I due isomeri ottici del cloramfenicolo sono dotati di attività antiamebiche non molto diverse, dirette, per quanto non forti.

L'attività di alcuni antiamebici inizia a manifestarsi rapidamente (clorotetraciclina, pirimetamina, tricomicina), di altri dopo alcune ore (yatren, clorochina, carbarsone, ossitetraciclina, tetraciclina).

La lentezza dell'azione della fumagillina e dell'emetina su *E. invadens* viene posta in relazione con la lentezza dello sviluppo di questo parassita dei serpenti.

Si riassumono le difficoltà dello «screening» in vitro di sostanze attive su *E. histolytica*, e si conclude che *E. invadens*, più che altre amebe a cisti tetra- e ottonucleate, può, sotto certe condizioni, essere usata a questo scopo.

SUMMARY

The «in vitro» action of 16 antibiotics and chemotherapeutics on *E. invadens* has been studied.

Cultures in monophasic medium placed in contact with the abovementioned substances and incubated at 26° C., were repeatedly examined under the microscope from 15 minutes up to the 14th day.

The results are compared with those obtained in similar conditions using 4 strains of *E. histolytica* incubated at 37° C. for 3 days.

In discussing the results, emphasis is laid on the fundamental analogous behaviour of the two species.

Some antibacterial antibiotics (dihydrostreptomycin, penicillin, bacitracin) have

been observed to be without any appreciable antiamebic action. Erythromycin also has poor activity « in vitro ».

The two optical isomers of chloramphenicol possess a fairly similar, direct although not very strong anti-amebic activity.

The activity of some anti-amebic substances begins to appear rapidly (chlorotetracyline, pyrimethamine, trichomycin), whilst others require several hours (Yatren, chloroquine, carbarsone, oxytetracycline, tetracycline).

Fumagillin and emetine act on *E. histolytica* after 24-30 hours, and on *E. invadens* after 4-6 days. The slowness of action on this parasite found in serpents, is related to the slowness of its metabolism.

The difficulties in « in vitro » screening of substances active on *E. histolytica* are pointed out, and it is concluded that *E. invadens* more than other amebae with tetranucleate or octonucleate cysts may, in certain conditions, be used for this purpose.

BIBLIOGRAFIA

Adams A. R. D., (1956): Treatment of intestinal amoebiasis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *50*, 109-113.

Anderson H. H., Bostick W. L., Johnstone H. G., (1953): Amebiasis-Pathology, Diagnosis and Chemotherapy, Charles C. Thomas publisher, Springfield-Ill. (U.S.A.).

Anderson H. H., Hansen E. L. (1950): The chemotherapy of amebiasis, *Pharmacol. Rev.*, *2*, 399-434.

Anderson H. H., Hansen E. L., Sah P. T., Cafiso J. R. (1947): Amebacidal and pharmacologic activities of carbarsone oxide (p-carbamidophenylarsenous oxide) and its dithiocarboxymethyl and dithiocarboxyphenyl derivatives, *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, *91*, 112-123.

Bakhsh J. (1936): The pharmacological actions of conessine and isoconessine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, *58*, 373.

Balamuth W. (1946): Improved egg yolk infusion for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa, *Am. J. Clin. Path. 16*, 380-384.

Balamuth W. (1953): Comparative action of selected amebicidal agents and antibiotics against several species of human intestinal amebae, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *2*, 191-205.

Balamuth W. (1955): In vitro approaches to the chemotherapy of amebiasis, *Antibiot. Med.*, *1*, 625-631.

Balamuth W., Brent M. M., (1950): Biological studies on *Entamoeba histolytica*. IV. Direct action of the antibiotic prodigiosin., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *75*, 374-378.

Balamuth W., Thompson P. E. (1955): Comparative studies on Amebae and amebicides, *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, *2*, 277-345. Academic Press, New York.

Barret H. P., Smith N. M. (1926): The cultivation of *Endamoeba ranarum*, *Ann. Trop. Med. Paras.*, *20*, 85.

Baud C. A., Bober F., (1952): Caractères ultrastructuraux et classification systématique de deux amibes parasites, *C. R. Soc. Biol., Paris*, *146*, 834.

Beltràn E. (1948): Epidemiologia de las infecciones con *Endamoeba histolytica*. Sect. VIII, Protozoan diseases, *Proc. 4th. Internat. Cong. on Trop. Med. & Malaria, Washington*, *2*, 1056.

Bishop A., (1937): Further observations upon *Entamoeba aulastomi* Nöller, *Parasitology*, *29*, 57.

Boeck W. C., Drbohlav J. (1925): The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, *5*, 371.

Brackett S., Bliznick A. (1947): The rate of multiplication of *Edamoeba histolytica* and its relation to in vitro drug testing and possibly to nutritional studies, *J. Parasit.*, *33*, 154-166.

BRUMPT E. (1925): Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n.sp., amibe à kystes quadrinuclées parasite de l'homme, *Bull. Acad. Méd.*, *94*, 943-952.

BRUMPT E., (1939): Une dysenterie ambienne expérimentale, fatale pour les Vipères, pourrant probablement être utilisée pour la destruction de ces Reptiles, *C. R. Acad. Sci., Paris*, *209*, 362.

BRUMPT E. (1949): Précis de Parasitologie, 6ª ed., Masson et C.ie, Paris.

BURROWS R. B., SWERLOW M. A., FROST J. K., LEEPER C. K. (1954): Pathology of *Dientamoeba fragilis* infections of the appendix, *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, *3*, 1033-1039.

DE CARNERI I. (1956): Azione dei due antipodi ottici del cloramfenicolo e dei Treo-1. P. nitrofenil-2. amino-1,3-propandiol. enantiomorfi su alcuni protozoi parassiti, *Il Farmaco*, *11*, 926-933.

DE CARNERI I. (1957): In corso di stampa.

DE CARNERI I. (1957b): In corso di stampa.

DE CARNERI I., FACHINELLI E. (1954): Ricerche « in vitro » e « in vivo » sull'associazione diidrostreptomicina-isonicotinilidrazide, *Giornale italiano di Chemioterapia*, *1*, 561-564.

CLAMPIT J. M. (1948): Comparative therapy of *Endamoeba histolytica* infections in kittens, *Am. J. Trop. Med.*, *28*, 289-294.

CRAIG C. F. (1944): *The etiology, diagnosis and treatment of amoebiasis.* Baltimore, 332.

DENNIS E. W., BERBERIAN D. A., HANSEN S., (1949): Amebacidal activity of bismuthoxy-p-N-glycolylarsanilate and 7-iodo-4- methyl-4-diethylaminobutylamino) quinoline diphosphate, *Amer. J. Trop. Med.*, *29*, 683-689.

DERRICK E. H., (1948): A fatal case of generalized amoebiasisi due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Jodamoeba Bütschlii*, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *42*, 191.

DOBELL C., LAIDLAW P. P. (1926): On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae, *Parasitology*, 18, 283.

ELLENBERG M. (1946): Amoebiasis: role of bacteria in symptomatology; sigmoiloscopic fiindings in symptomatic and asymptomatic cases; effect of sulfadiazine on symptoms and sigmoidoscopic findings, *Am. J. Digest. Dis.* *13*, 356.

ELSDON-DEW R. (1949): Endemic fulminating amebic dysentery, *Am. J. Trop. Med.*, *29*, 337-340.

ELSDON-DEW R., (1954-55): Antibiotics in acute ulcerative amebic colitis, *Antibiotics Annual*, 869-875.

FAUST E. C. (1954): *Amebiasis*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., U.S.A.

FELSENFELD O., KADISON E. R., ISHIHARA S. J. (1951): *In vitro* and *in vivo* tests with newer antibiotics against *Endamoeba histolytica*, *Am. J. Pub. Health*, *41*, 1078-1081.

FISCHER L., REICHENOW E. (1952): Protozoenkrankheiten, 1/2; 421-719 in: Mohr L., Staehlin R, 1952. *Handbuch der inneren Medizin*, Springer Verlag, Berlin.

FULTON J. D., JOYNER L. P. (1948): Natural amoebic infections in laboratory rodents, *Nature*, *161*, 66-68.

GEIMAN Q. M., RATCLIFFE H. L. (1936): Morphology and life-cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptiles, *Parasitology*, *28*, 208

GOODWIN L. G., HOARE C. H., SHARP I. M. (1948): Chemoteraphy of amoebiasis, *Brit. J. Pharmacol.*, *3*, 44-71.

HANSEN E. L., BENNET B. M. (1952): Effects of toxic agents on *Endamoeba histolytica*, *Exp. Parasit.*, *1*, 143-156.

HILL W. C., OSMAN & NEAL R. A. (1954): An epizootic due to *Entamoeba invadens* at the gardens of the Zoological Society of London, *Proc. Zool. Soc. Lond.*, *123*, 731.

HOARE C. A. (1949): *Handbook of medical protozoology for medical men, parasitologists and zoologists*, Bailliere, Tindall and Cox, London.

HOARE C. A. (1950): Amoebiasis in Great Britain with special reference to carriers, Brit. Med. J. 238-241.

HOARE C. A. (1952): The taxonomic status of biological races in parasitic protozoa, *Proc. Linn. Soc. London.*, *163*, 44.

HOARE C. A. (1955): Intraspecific biological groups in pathogenic protozoa, *Refuah Veterinarith*, *12*, 263-258.

ILOWAISKY S. (1922): Epatite amebica in *Rana temporaria*, *Arch. Soc. Rus. Protistol.*, *1*, 82.

JACOBS L. (1947): The elimination of viable bacteria from cultures of *E. histolytica* and the subsequent maintenance of such cultures. *Am. J. Hyg.*, *46*, 172-176.

JONES W. R. (1946): The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds, *Ann. Trop. Med.*, *40*, 130-140.

JONES W. R. (1952): Experimental attempt to induce drug-resistance in *Entamoeba histolytica*, *J. Exp. Parasit.*, *1*, 118-128.

KANEKO T., KUKODA H., UEDA T. (1955): Syntheses and biological test of aromatic thiocyano and related compounds, *J. Pharm. Soc. Japan*, *75*, 303-305.

LAMY L. (1948): Obtention simple d'une culture pure temporaire d'amibes parasites, *C. R. Acad. Sci, Paris*, *226*, 1400.

LAMY L. (1948b): Obtention d'une culture bactériologiquement pure d'amibes parasites pathogénes (*Entamoeba invadens*, Rodhain) ne comportant aucune addition de germes bactériens morts, ni d'aucun extrait microbien, *C. R. Acad. Sci., Paris*, *226*, 2021.

LUTTERMOSER G. W., HASKINS W. T., COLEMAN N., JUMPER J. R. (1952): Experimental *Endamoeba histolytica* infections in rabbits with reference to chemotherapy, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *1*, 162-170.

LYNCH J. E., BAMFORTH B. J., GOECKERITZ D. (1956): The laboratory evaluation of antiamebic activity. The comparative results obtained by the use of in vitro and in vivo methods, *Antib. & Chemother.*, *6*, 330-336.

LYNCH J. E., ENGLISH A. R., BAUCK H., DELIGIANIS H. (1954): Studies on the « in vitro » activity of anisomycin, *Antibiot. & Chemother.*, *4*, 844-848.

McCONNACHIE E. W. (1954): The action of amoebicidal drugs on *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934 « in vitro », *Parasitology*, *44*, 132.

McCONNACHIE E. W. (1955): Studies on *Entamoeba invadens* RODHAIN, 1934, « in vitro » and its relationship to some other species of *Entamoeba*, *Parasitology*, *45*, 452-481.

McCONNACHIE E. W. (1956): Modification and elimination of the bacterial flora in cultures of *Entamoeba invadens* RODHAIN, 1934, *Parasitology*, *46*, 117-129.

McCOWEN M. C., CALLENDER M. E., RENNEL T., LAWLIS J. (1954): Amebacidal activity of a series of synthetic diamines, *Antib. & Chemother*, *4*, 753-762.

McCOWEN M. C., LAWLIS J. (1950): Experimental amebiasisi in rats with cultivated cysts, *J. Parasitol.*, *36*, 25.

MEEROVITCH E., (1955): A preliminary note on the experimental infection of chick embrios with *Entamoeba invadens*, *Canadian J. Microbiol.*, *1*, 284-287.

MILLER L. C., TAINTER M. L. (1944): Estimation of the ED_{50} and its error by means of logarithmic-probit graph paper, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, *57*, 261-264.

MILLER M. J. (1951): A method for « in vitro » culture of *Entamoeba invadens* free from bacteria, *Canadian J. Comp. Med.*, *15*, 268.

MILLER M. J. (1953): Bacteria free *Entamoeba invadens*, *Nature, London.*, *172*, 1192.

MUDROW-REICHENOW L. (1954): Die Wirkung von Neoteben (Isonicotinsäurehydrazid) auf den Erreger der Rattenlepra. *Z. Tripenmed. Parasitol.*, *5*, 218-227.

MÜHLPFORDT H., MARTINEZ-SILVA R. (1956): Die Wirkung von Isoconessin und Neoconessin im Vergleich zu Conessin und Emetin auf *Entamoeba histolytica* « in vitro », *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, *7*, 211-219.

NAKAMURA M., ANDERSON H. (1951): Evaluation of some chemotherapeutics against *Endamoeba histolytica* in cultures with *Trypanosoma cruzi*, *Exper. Parasitol.*, *1*, 66-69.

NEAL R. A. (1953): Studies on the morphology and biology of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, *Parasitology*, *43*, 253.

NEAL R. A., VINCENT P. (1955): Strain variation in *Entamoeba histolytica*. I. Correlation if invasiveness in rats with the clinical history and treatment of the experimental infections, *Parasitology*, *45*, 152-162.

PATERSON J. C. (1935): The diagnosis and treatment of intestinal amebiasis. *Canad. Med. Ass., J.*, *32*, 399-404.

PAVLOVA E .A. (1938): Sur les méthodes de la culture d'*Entamoeba histolytica*, *Med. Parasit. & Parasitic. Dis.* Mosca, 7, 224. (in russo: riass. in francese a pag. 227). Riassunto in *Trop. Dis. Bull.* 1939. *36*, 286.

PFANNEMUELLER L. (1956): Treatment of amoebiasis with resotren, *Lancet*, 934-935.

PHILLIPS B. P. (1951): Comparative effects of certain species of trypanosomidae on the growth of *Endamoeba histolytica* in the absence of bacteria, *Am. J. Trop. Med.*, *31*, 290-294.

PHILLIPS B. (1951): Measurements of direct amebicidal potential by a micro-méthod for the screening of drugs «in vitro», *Am. J. Trop. Med.*, *31*, 561-565.

PIZZI T. (1956): Observaciones sobre fagicitosis de eritrocitos par *Etamoeba moshkovskii* TSHALAIA, 1941, *Bol. Chileno Parasitol.*, *11*, 7-9.

PORTER R. J. (1953): Amebiasis, *Ann. Rev. Microbiol.*, *7*, 273-294.

PYMAN F. L. (1937): Chemotherapy of amoebiasis, *Nature*, *140*, 832-834.

RACTCLIFFE H. L., GEIMAN Q. M. (1933): Eleven cases of amoebiasis in reptiles. *J. Parasit.* *20*, 139.

RATCLIFFE H. L., GEIMAN Q. M. (1934): Amebiasis in reptiles, *Science*, *79*, 324.

RATCLIFFE H. L., GEMAIN Q. M. (1938): Spontaneous and experimental amebic infection in reptiles, *Arch. Path.*, *25*, 160.

RAY H. N., MUKHERJEE A. K., SEN GUPTA P. C., DAS GUPTA B. (1955): The cytological and cytochemical pattern of *Endamoeba invadens*, *Bull. Calcutta Schol Trop. Med.*, *3*, 63-54.

REICHENOW E. (1952): Grundriss der Protozoologie für Aerzte und Tierärzte, J. A. Barth. Verlag, Leipzig.

REICHENOW E., in: DOFLEIN F.+, REICHENOW E. (1953): *Lehrbuch der Protozoenkunde*, sesta edizione, Jena.

RODHAIN J. (1934): *Entamoeba invadens* n.sp., parasite de serpents, *C. R. Soc. Biol. Paris*, *117*, 1195

RODHAIN J., VAN HOOF M. T. (1934): Note préliminaire sur le rôle pathogène possible d'*Entamoeba invadens* chez les serpents, *C. R. Soc. Biol., Paris*, *117*, 1199.

RODHAIN J., VAN HOOF M. T. (1935): Sur le rôle pathogène d'*Entamoeba invadens*. *C. R. Soc. Biol., Paris.*, *118*, 1646.

RODHAIN J., VAN HOOF M. T. (1937): Essais d'infestation de rongeurs divers par *Entamoeba invadens*, *C. R. Soc. Biol.*, *126*, 1241.

RUSSELL P. F. (1956): World-wide malaria distribution, prevalence, and control, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *5*, 937-965.

SANDERS E .P. (1931): The life-cycle of *Entamoeba ranarum*, Grassi (1879), *Arch. Protistenk.*, *74*, 365.

SENECA H. (1954): The synergistic amebicidal effect of tetracycline, oxytetracyline and carbomycin on cultures of *Endamoeba histolytica*, *Am. J. Med. Sci.*, *228*, 16-20.

SHAFFER J. G. (1953): Factors affecting the propagation of *Endamoeba histolytica in vitro* in the S-F medium and in tissue bearing substrate, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *56*, 1033-1047.

SHAFFER J. G., BIEGELEISEN J. Z. (1951): The in vitro effect of aureomycin and chloromycetin on cultures of *Endamoeba histolytica* and *Trichomonas hominis*, *Am. J. Hyg.*, *53*, 139-145.

SHAFFER J. G., FRYE W. W. (1948): Studies on the growth requirements of *Endamoeba histolytica*. I. Maintenance of a strain of *E. histolytica* through one hundred transplants in the absence of an actively multiplying bacterial flora, *Am. J. Hyg.*, *47*, 214-221.

SMITH R. M., JOSLYN D. A., GRUHZIT O. M., MCLEAN I. W., PENNER M. A., EHRLICH J., (1948): Chloromycetin: Biological studies, *J. Bact.*, *55*, 425-448.

STEWARD J. S. (1955): Anthelmintic studies: III. A taeniacidal testing technique, *Parasitology*, *45*, 255-265.

TAYLOR J., GREENBERG J. (1952): Experimental chemotherapy of *Endamoeba histolytica* infections in the guinea pig. *Am. J. Hyg.*, *56*, 58-70.

THOMPSON P. E. (1955): The evaluation of antiamebic drugs in experimental animals, *Antib. Med.*, *1*, 603-610.

THOMPSON P. E., DUN M. C., BAYLES A., REINERTSON J. W. (1950): Action of chloramphenicol (Chloromycetin) and other drugs against *Endamoeba histolytica* « in vitro » and in experimental animals, *Am. J. Trop. Med.*, *30*, 203-215.

THOMPSON P. E., LILLIGREN B. M. (1949): Chemotherapy of experimental *Endamoeba histolytica* infections in dogs, *Am. J. Trop. Med.*, *29*, 323-336.

THOMPSON P. E., MCCARTHY D. A., BAYLES A., REINERTSON J. W., COOK A. R., (1956): Comparative effects of various antibiotics against *Endamoeba histolytica* « in vitro » and in experimental animals, *Antibiot. & Chemother.*, *6*, 337-350.

THOMPSON P. E., REINERTSON J. W. (1951): Chemotherapy of amebic hepatitis in hamsters with emetine, chloroquine, amodiaquin (camoquin), quinacrine and other drugs, *Amer. J. Trop. Med.*, *31*, 707-717.

THOMPSON P. E., REINERTSON J. W., BAYLES A., MCCARTHY D. A., ELSLAGER E. F. (1954): Antiamebic action of 5-chloro-7-diethylaminomethyl-8-quinolinol and other 8-quinolinol derivatives, *Abstracts of Papers, 125 Meeting, Am. Chem. Soc., 6M.*

THOMPSON P. E., REINERTSON J. W., BAYLES A., MCCARTHY D. A., ELSLAGER E. F. (1955): Antiamebic action of 5-chloro-7-diethylaminomethyl-8-quinolinol and other substituted 8-quinilinol in vitro and in experimental animals, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *4*, 224-248.

WENRICH D. H. (1944): Studies on *Dientamoeba fragilis* 4. Further observations with an outline of present-day knowledge of this species, *J. Parasitol.*, *30*, 322.

WESTPHAL A. (1937): Betrachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Virulez der *Entamoeba histolytica* beim Menschen, *Arch. f. Schiffs. u. Tropen-Hyg.*, *41*, 262.

WESTPHAL A. (1941): Ein Kulturverfahren für *Entamoeba gingivalis und dessen* Anwendung für die Diefferentialdiagnose von *E. gingivalis* und *E. histolytica*, *D. tropenmed. Z.*, *45*, 685.

WESTPHAL A. (1948): Zur Epidemiologie und Pathogenese der Amöbenruhr in Nordafrika 1941/42. *Z. Hyg. 128*, 73.

WILSON G. S. (1922): The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting, *J. Bact.*, 7, 405-446.

WOODRUFF A. W. (1956): Symposium on the treatment of human amoebiasis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *50*, 136-138.

YOELI M. (1955): A report on intestinal disorders accompanied by large numbers of *Dientamoeba fragilis*, *J. Trop. Med. Hyg.*, *58*, 38-41.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVIII - N. 3 - Luglio 1957

LA FORMAZIONE DEI GUSCI EMBRIONALI E LA MORFOLOGIA DELL'UTERO IN *PARICTEROTAENIA POROSA* (RUD., 1810) QUALI ELEMENTI DI GIUDIZIO PER LA VALIDITA' DEL GEN. *PARICTEROTAENIA* FUHRMANN, 1932. (CESTODA, *DILEPIDIDAE*).

FRANCO V. BONA (*)

I. Introduzione

1) *Il gen. Paricterotaenia. Difficoltà e divergenze nella diagnosi delle capsule uterine.*

Il Fuhrmann (1932) così definisce il gen. *Paricterotaenia*: « Dilepidinae con rostello armato da una sola corona di uncini; pori sessuali irregolarmen-

(*) *Istituto di Zoologia della Università di Torino*, (Direttore: Prof. L. Pardi).

te alterni; condotti sessuali compresi tra i vasi escretori; testicoli numerosi situati posteriormente all'ovario; utero sacciforme; parassita di Uccelli, raramente di Mammiferi. Specie tipo: *P. porosa* (Rud., 1810)». Esso differisce da *Choanotaenia* Railliet, 1896 essenzialmente per la mancanza di capsule uterine, e da *Anomotaenia* Cohn, 1910 per la presenza di una sola corona di uncini. Il gen. *Paricterotaenia* assume così una posizione assai importante in seno alla fam. dei *Dilepididae*, permettendo una comoda e relativamente facile distinzione, almeno morfologica, in un gruppo ricco di specie dall'anatomia sovente molto simile.

Nella sua ridescrizione di *P. porosa*, il Lopez - Neyra (1951) asserisce di aver osservato *capsule uterine;* fatto questo di per sè sufficiente ad invalidare il genere rendendolo sinonimo di *Choanotaenia* Railliet, 1896.

A commento delle conclusioni cui è giunto il Lopez - Neyra, Joyeux e Baer (1954) così si esprimono: « Il faudrait, notamment, reprendre toute la question de la formation de l'oeuf et des capsules ovifères, car dans bien des cas, nous semble-t-il, l'enveloppe externe de l'oeuf, entourant l'embryophore, a été interprétée comme étant une capsule. Or de pareilles "capsules" se rencontrent à l'intérieur d'un uterus intact et ne peuvent par conséquent, être assimilées à des capsules ovifères ». Inoltre da diversi anni nei generi *Paricterotaenia* Fuhrm., *Anomotaenia* Cohn e *Choanotaenia* Railliet esiste una grande confusione dovuta al fatto che di molte specie non si conosce l'utero maturo. Tale situazione si aggrava quando, ai dubbi per mancanza di materiale e di osservazioni, si aggiungono disaccordo ed errori sulle modificazioni cui va incontro la parete dell'utero, sulla presenza di capsule ovifere e sulla formazione dei gusci embrionali, tutti particolari questi necessari alla esatta ripartizione delle specie nei rispettivi generi. Sovente le descrizioni degli involucri embrionali mancano di chiarezza, perchè non si tiene conto che i gusci — tranne la « membrana vitellina » (1) — hanno uno spessore, talvolta considerevole: capita che vengano indicati come gusci i limiti di separazione tra un involucro e l'altro, oppure strati differenziatisi in seno ad un solo guscio.

Le affermazioni del Lopez - Neyra vanno perciò rivedute alla luce di un esame istologico dell'utero e delle uova, indispensabile per comprendere lo sviluppo delle une e le modificazioni dell'altro, e per superare le incertezze che ancor oggi esistono nella interpretazione degli involucri embrionali e delle capsule uterine.

Tale esame ha dimostrato, come vedremo, che l'utero di *P. porosa* non si risolve in capsule uterine, ma diventa una ampia cavità sacciforme dopo una prima fase reticolare e ramificata. Di conseguenza viene riconosciuta esatta la definizione del genere data dal Fuhrmann ed il posto che gli era stato assegnato nella s. fam. dei *Dilepidinae*, e viene pure a mancare la premessa al rimaneggiamento sistematico effettuato dal Lopez - Neyra (1951-1952).

---

(1) Vedi nota 2 a pag. 158.

2) *Sul concetto di capsula uterina nei Dilepididae.*

Si parla di *capsule uterine uniovulari* quando l'utero, iniziando per lo più il suo sviluppo come organo reticolare e molto ramificato, nel corso della sua maturazione si frammenta in tante piccole cavità chiuse, delimitate dalla primitiva parete uterina e contenenti ciascuna un embrione. Sulla esistenza e natura delle cosiddette *capsule parenchimatose uniovulari* nei *Dilepididae*, alla cui formazione parteciperebbe, oltre alla parete dell'utero, anche il parenchima, permangono ancora molti dubbi (Bona, 1955-56). Un'altra forma di capsula ovifera, fuori discussione in questo caso, è quella pluriovulare, racchiudente cioè più embrioni. Anche qui si vorrebbe distinguere tra *capsule parenchimatose pluriovulari* e *capsule uterine pluriovulari*. E' ancora da stabilire se tali capsule pluriovulari nei *Dilepididae* siano omologhe a quelle dei *Davaineidae*.

Non sappiamo se la capsula uterina uniovulare, nel momento in cui l'oncosfera lascia la proglottide, permanga attorno ad essa, fungendo da involucro supplementare esterno, oltre ai soliti due gusci propri dell'embrione, oppure se si laceri, liberando l'oncosfera, come una qualsiasi parete di utero che viene abbandonato con la proglottide. Un'opinione diffusa, stando ad alcune descrizioni di capsule uterine, è che esse accompagnino l'embrione; osservazioni personali mi fanno però dubitare dell'esattezza di tale modo di vedere. Sovente l'involucro, considerato come capsula, che accompagna l'oncosfera fuoriuscita dalla proglottide, altro non è che il guscio esterno o, persino, l'embrioforo Troppe volte si sono verificate simili confusioni e troppo scarsi sono a tutt'oggi i controlli istologici per accettare senza riserve tutto quanto è stato detto in proposito. Veramente sorprendente è il fatto che questa confusione tra capsula e gusci si sia talvolta verificata quando realmente una capsula uterina esisteva: correttamente individuata fino ad un certo stadio di sviluppo dell'utero, venne scambiata con uno dei gusci al termine della maturazione.

L'osservazione limitata all'oncosfera matura permette, generalmente, di individuare con sicurezza soltanto l'embrioforo, involucro derivato tardivamente dal guscio interno, dall'aspetto rifrangente, resistente e compatto, mentre lascia sovente incertezza sul guscio esterno, il quale, secondo le specie, può scomparire del tutto, ridursi ad uno straterello insignificante attorno all'embrioforo oppure diventare turgido ed enorme come in *Paricterotaenia porosa*. Inoltre, il guscio esterno, data la sua delicatezza, sovente si altera o si perde durante la confezione dei preparati. D'altra parte, non essendo facile interpretare i vari involucri concentrici attorno all'embrione nel periodo di maturazione, durante il quale subiscono profondi mutamenti (a volte un guscio può comparire sdoppiato), è bene risalire all'inizio dello sviluppo dell'uovo per rintracciare fin dai primi stadi le cellule e le strutture appartenenti all'uno o all'altro guscio, seguendole poi fino a quando i gusci hanno assunto la loro forma definitiva.

II. Materiale e metodi.

Date le dimensioni relativamente grandi degli embrioni, *Paricterotaenia porosa* fornisce un materiale particolarmente adatto a uno studio istologico. Buona parte degli esemplari furono raccolti personalmente a Torino in *Larus ridibundus* L.; altri mi vennero procurati dalla Svizzera, Inghilterra e Danimarca, e per questi ultimi devo ringraziare il Dott. Guildal di Copenaghen. Ebbi inoltre a disposizione numerosi preparati delle collezioni dell'Istituto di Zoologia della Università di Neuchâtel e dell'Istituto di Parassitologia della Università di Granada per i quali rivolgo un particolare ringraziamento ai Professori J. G. Baer e C. R. Lopez-Neyra.

Il materiale, sia per preparati in toto che per l'esame istologico, è stato fissato in sublimato saturo e in Bouin-Hollande. L'acido acetico tuttavia è sconsigliabile per la fissazione dei Cestodi, anche quando si tratta di esemplari destinati ad essere semplicemente montati in toto. I metodi di colorazione usati per preparati istologici sono l'emallume-eosina, il blu di toluidina, l'Azan e il PAS (reattivo di Schiff dopo ossidazione periodica).

Le osservazioni sui diversi involucri embrionali e sui primi stadi di sviluppo, oltre che su sezioni istologiche, si possono effettuare su embrioni liberati dall'utero per dilacerazione. Si può operare con materiale vivo in soluzione fisiologica o fissato e poi montato in glicerina. In questo caso, per evitare contrazioni, si immergono le proglottidi intere in glicerina molto diluita con acqua e si lascia poi evaporare, eventualmente scaldando leggermente in termostato, fino a concentrazione voluta. In seguito si effettua la dilacerazione.

III. Gli involucri embrionali e l'utero (1).

1) *La « membrana vitellina ».*

Le uova, appena giunte nell'utero, appaiono ricoperte dalla cosiddetta « membrana vitellina » (2) che include pure i residui e il nucleo della cellula vitellina (Tav. I, fig. 1 e 4; Fig. 2-A_1). In *P. porosa* tale membrana non è caduca nè transitoria, perchè negli stadii avanzati di maturazione — pur non potendo più essere individuata come struttura indipendente, in quanto aderisce intimamente al guscio esterno — è sempre presente e perfino più appariscente che all'inizio della sua formazione, se si giudica in base alla metacromasia, alla PAS - positività e alla affinità per il blu di anilina.

Non intendo discutere ora la formazione di questa membrana e quale parte vi abbiano la ghiandola di Mehlis, la cellula vitellina e il secreto dell'utero. Per chiarire tale processo sarà necessario abbinare all'indagine morfologica quella istochimica, specialmente sui mucopolisaccaridi e sulle proteine, e non limitarsi a semplici accostamenti di affinità tintoriali istologiche. Tuttavia le osservazioni su *P. porosa* sembrano indicare sin da ora:

(1) Data l'eterogeneità degli argomenti trattati, la discussione della letteratura seguirà immediatamente in ogni singolo paragrafo alla esposizione delle ricerche personali.

(2) Corrisponde alla « coque », « Eischale », « chorion », « shell », e talvolta alla impropriamente detta « capsule » di lingua inglese. Il termine di « membrana vitellina », adottato dal Lopez-Neyra, ha qui un significato particolare: esso designa una membrana secondaria che non corrisponde affatto a quella primaria di egual nome.

1) che nell'uterodotto, cioè dopo il passaggio attraverso la ghiandola di Mehlis, l'uovo non sia avvolto da alcuna membrana secondaria;

2) che la cellula vitellina si espanda alla superficie dell'uovo poco prima che questo penetri nell'utero;

3) che parte delle sostanze contenute nella cellula vitellina vengano cedute all'uovo e parte vengano utilizzate nella formazione della membrana e del liquido in cui l'uovo è sospeso all'interno della membrana stessa; (1)

4) che la membrana si formi o si completi solo quando l'uovo cade nella cavità uterina;

5) che il secreto contenuto nell'utero si aggiunga alle sostanze vitelline per la formazione della membrana o se non altro aderisca alla sua superficie col compito di consolidarla, non solo in principio ma anche nel corso della maturazione dell'embrione e dell'ingrossamento dei gusci sottostanti;

6) che le sferule della cellula vitellina non si sparpaglino nel secreto uterino, e non partecipino alla sua formazione, anche se inevitabilmente ne vengano a contatto alla superficie dell'uovo; (2)

7) che le rare cellule vitelline rintracciate nell'utero prima che vi penetrino le uova non partecipino alla formazione del secreto uterino — che compare fin dai primi abbozzi di cavitazione dell'utero —, perchè sono sempre integre; si debbono perciò considerare sfuggite alla ghiandola vitellina senza alcun particolare significato funzionale;

8) che il secreto uterino sia prodotto dalla parete uterina anche se questa non possiede una tipica struttura di epitelio secernente. (3)

Tali osservazioni sembrano per ora giustificare l'appellativo di « membrana vitellina », pur tenendo presente che anche nei Ciclofillidei il secreto dell'utero potrebbe avere una importanza notevole nella sua formazione. La « membrana vitellina », che non esiste solo in *P. porosa* ma in tutti i Ciclofillidei, va considerata come omologa al guscio opercolato degli Pseudofillidei e Trematodi.

Lo SMYTH (1951), in seguito ad osservazioni su *Taenia saginata*, nega l'esistenza di una tale membrana, e pensa che la sua mancanza sia un carattere pe-

---

(1) Lo SMYTH (1951), pensando che nei Ciclofillidei non esista una membrana vitellina e che tutto il contenuto della cellula vitellina venga ceduto all'uovo — anzi egli parla di mancanza di « guscio esterno » e ammette soltanto l'esistenza di un embrioforo — propone per l'organo vitellino i termini di « vitellogeno » nei Ciclofillidei e di « vitellocalycal gland » negli Pseudofillidei e Trematodi, in cui le cellule vitelline cedono parte delle loro sostanze all'uovo e parte all'involucro più esterno, resistente ed opercolato.

(2) OGREN (1956) descrive in *Mesocestoides Corti* una vera mescolanza del secreto uterino con le sferule vitelline, comprese quelle provenienti, come dice l'Autore, dal vitello eliminato dall'uovo.

(3) Processo di secrezione messo chiaramente in evidenza nei *Tetrabothriidae* da BAER (1954).

culiare di tutto l'ordine. SILVERMAN (1954) invece, descrive una membranella esterna avvolgente l'uovo, denominandola «chorion», proprio in *Taenia saginata* e *Taenia pisiformis*, esattamente come una «coque» era stata descritta a suo tempo da v. BENEDEN (1881) nelle medesime specie, ed una «Eischale» veniva dopo di lui confermata da v. JANICKI (1907) in *Taenia serrata* (=*pisiformis*). Anche ST. REMY (1900) parla di una identica membrana negli *Anoplocephalidae* e OGREN (1955 e 1956) in *Hymenolepis* e *Mesocestoides* (1).

Sempre lo SMYTH (1956), in un recente lavoro istochimico, riconferma le proprie vedute: «...a difficulty arises when the Cyclophyllidean cestodes are considered. In these forms an external egg-shell homologous with the egg-shell of *Fasciola* or *Schistocephalus* is not formed ... the so-called "egg-shell" is in reality a thickened embryophore...» (p. 535). La difficoltà incontrata dallo SMYTH per una interpretazione unitaria delle reazioni istochimiche dell'involucro esterno dell'uovo negli Pseudofillidei e nei Trematodi e dell'embrioforo nei Ciclofillidei, reazioni assai diverse — essendo probabilmente il primo di natura sclerotinica e il secondo di natura cheratinica — è dovuto al fatto che vengono messe a confronto strutture di origine e posizione, rispetto all'embrione, totalmente differenti. Infatti l'embrioforo, o meglio il guscio interno, di origine embrionale, da cui deriva l'embrioforo (vedi oltre), è omologo, con tutta probabilità, allo strato ciliato del coracidio, mentre, come si è detto, omologa all'involucro esterno dell'uovo degli Pseudofillidei è la «membrana vitellina», che è una membrana secondaria. Certamente si otterranno anche con i Ciclofillidei risultati confrontabili a quelli ottenuti dallo SMYTH con Pseudofillidei e Trematodi da una ricerca istochimica che tenga conto della omologia della «membrana vitellina» — qui stabilita morfologicamente — e che venga estesa a uova di Ciclofillidei al completo di tutti gli involucri, e non limitata a uova di *Taeniidae* che, a maturazione ultimata, hanno perduto gli strati esterni all'embrioforo.

2) *Prime segmentazioni dell'uovo e separazione delle cellule destinate ai gusci propri dell'embrione.*

L'uovo di *P. porosa* è molto ricco di vitello, distribuito in grosse sferule (2). Le divisioni di maturazione e la penetrazione dello spermatozoo (già abbinato in precedenza all'ovocellula) avvengono nell'utero dopo la formazione della «membrana vitellina» (3). I nuclei dei globuli polari, circondati da un

---

(1) OGREN (1955 e 1956) usa indicare la «membrana vitellina» indifferentemente come «shell» e «capsule». Questa terminologia è sconsigliabile, in quanto per *capsula*, trattandosi di uova e di utero di Cestodi, si intende tutt'altra cosa.

(2) La quantità di vitello e la forma che assume nell'uovo possono variare moltissimo da una specie all'altra. Può presentarsi sotto forma di sferule più o meno grandi e numerose, di granulazioni assai fini, o anche di una unica (o di poche) grosse sfere.

(3) Lo spermatozoo non ha potuto essere osservato con sicurezza.

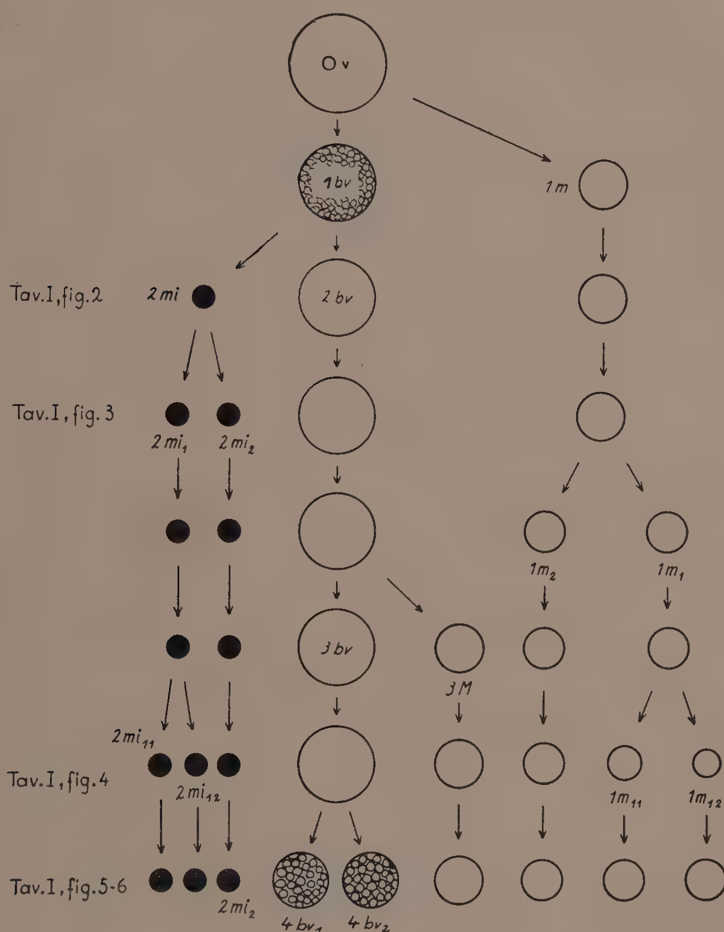


Fig. 1. — Prime segmentazioni dell'uovo di *Paricterotaenia porosa*, fino allo stadio di nove blastomeri, momento in cui si separano le due cellule ricche di vitello destinate al guscio esterno dell'oncosfera e derivate dall'ultima divisione del blastomero vitellino. - Ov: uovo fecondato. - bv: blastomero vitellino. - m: mesomeri. - mi: micromeri. - M: macromero. - 4 bv_1 e 4 bv_2 : i due « blastomeri vitellini » destinati al guscio esterno.

La cifra che precede le lettere indica il numero d'ordine di mitosi (dell'uovo e del blastomero vitellino) dalla quale prende origine una determinata genealogia cellulare. Ogni cifra che segue le lettere (indipendentemente dal suo valore numerico) indica una divisione subita dalla cellula considerata. Da ogni divisione, che non sia quella del blastomero vitellino, prendono origine due cellule contrassegnate 1 e 2. Si è cercato di attenersi, nella misura del possibile, al tipo di nomenclatura usata per i Turbellari.

Sulla sinistra la corrispondenza con le microfotografie.

piccolo alone chiaro di citoplasma, rimangono formati dalla piccola masserella di cromatina compatta ed intensamente colorabile espulsa dall'uovo, e non assumono perciò più l'aspetto normale di un nucleo. Si distinguono facilmente poichè il I° possiede una massa cromatinica sferica, mentre il II° la possiede a mezza luna. Non è stata notata una divisione del I° globulo. Essi vengono emessi, come già osservava lo SPAETLICH (1926), in direzione della cellula vitellina, oramai molto ridotta ed appiattita, e specialmènte il primo vi si affianca in modo caratteristico, quasi da sembrarvi incorporato (Tav. I, fig. 1). Rimane in tal modo fissato uno dei poli dell'uovo, nel senso che i più piccoli tra i primi blastomeri, derivati da divisioni profondamente disuguali, si accumulano anch'essi in quella direzione (Tav. I, Fig. 2).

Dalla prima divisione dell'uovo si formano un blastomero molto grosso (*1bv*), con l'aspetto primitivo dell'uovo, e cioè con nucleo molto grande e, sembra, tutto il vitello, ed un mesomero (*1m*) assai più piccolo. Il primo verrà perciò indicato come «blastomero vitellino» («dotterhaltige Blastomere» di SPAETLICH) (1) e lo si può considerare come la cellula capostipite delle categorie di blastomeri che ancora si formeranno. (Fig. 1; Fig. 2-A_1).

Nella seconda divisione si stacca dal blastomero vitellino un micromero (*2mi*). Si giunge così allo stadio facilmente osservabile di tre cellule: il blastomero vitellino (*2bv*), un mesomero (*1m*), un micromero (*2mi*) (Tav. I, fig. 2). Successivamente il primo a dividersi è in genere il micromero, che dà origine a due altri micromeri ($2mi_1$ - $2mi_2$). Certe volte sembra che questa divisione avvenga con un certo ritardo, cioè quando già si è diviso il mesomero (*1m*), che dà origine a due mesomeri molto simili al primo, solamente più piccoli ($1m_1$ - $1m_2$). Siamo allo stadio di cinque cellule. A questo punto il blastomero vitellino (*2bv*) produce una terza cellula (*3M*), di struttura apparentemente uguale a quella del mesomero formatosi con la prima divisione dell'uovo, ma solo di dimensioni maggiori. Per questa ragione *3M* verrà denominata macromero (2). Con questa divisione il blastomero vitellino è diventato *3bv*. In seguito si dividono uno dei primi due mesomeri, che genera due altri mesomeri di grandezza leggermente disuguale ($1m_{11}$ - $1m_{12}$), e un micromero, che genera altri due micromeri ($2mi_{11}$ - $2mi_{12}$). Non è stato possibile stabilire quale delle due cellule si divida per prima. Nel complesso le divisioni sono asincrone.

I nuclei dei micromeri mostrano segni evidenti di imminenti divisioni. Fin

---

(1) Lo SPAETLICH adopera anche, col medesimo significato, il termine di «dotterhaltige Makromere».

(2) Si tratta probabilmente della «granulierte Zelle» di SPAETLICH (nec «cellule granuleuse» Auctorum) che è l'ultima cellula, più grande delle altre, prodotta dal blastomero vitellino («dotterhaltige Blastomere») prima che questo vada incontro alla sua ultima divisione in due cellule ugualmente ricche di vitello, destinate al guscio esterno. (Vedi oltre). SPAETLICH avrebbe osservato una successiva divisione di questa «granulierte Zelle».

qui, e in tutti gli stadi che verranno considerati in seguito, si notano sempre i globuli polari ed il nucleo della cellula vitellina. Quest'ultimo, quando non è deformato, può essere facilmente scambiato per quello di un micromero. Ha dimensioni identiche e se ne distingue unicamente per la sua struttura a granuli fini di nucleo a riposo. Anche dal citoplasma, estremamente scarso e disposto in strato regolare e poco colorabile attorno ai nuclei, si distinguono i micromeri dalla cellula vitellina (Tav. I, Fig. 2). Durante le divisioni il nucleo dei micromeri può diventare un piccolo ammasso sferico e compatto di cromatina, molto simile, anche nelle dimensioni, al nucleo del primo globulo polare, col quale non va confuso. Unica differenza apprezzabile è la maggiore regolarità di contorno del nucleo del globulo polare. Siamo ora allo stadio di otto cellule: il blastomero vitellino, un macromero, tre mesomeri e tre micromeri. Da principio i tre mesomeri sono tutti di dimensioni diverse, e tali sono anche i loro nuclei (Tav. I, Fig. 4), ma tendono però ben presto ad ugualizzarsi, rimanendo tuttavia sempre più piccoli del macromero. E' generalmente in questo momento, o poco prima che si compia la suddetta egualizzazione dei mesomeri, che il blastomero vitellino subisce l'ultima divisione, questa volta in due « blastomeri vitellini » uguali ($4bv_1$ - $4bv_2$), con vitello equamente distribuito (Tav. I, Fig. 6). Questi non si divideranno più e manterranno un grande nucleo nucleolato.

Questo stadio di nove blastomeri — due grandi cellule a vitello o « blastomeri vitellini » ($4bv_1$ - $4bv_2$), un macromero ($3M$), tre mesomeri ($1m_{11}$ - $1m_{12}$ - $1m_2$) e tre micromeri ($2mi_{11}$ - $2mi_{12}$ - $2mi_2$) — segna una tappa molto importante nello sviluppo dell'embrione, in quanto con l'ultima divisione del blastomero vitellino si sono formate le uniche due cellule destinate al guscio esterno. Queste ben presto si spostano ai lati della morula — non ai poli —, la avviluppano, e fondendosi assieme formano un sincizio bicellulare (Fig. 2 - A e B).

Da questo momento in poi i micromeri si dividono rapidamente formando cellule molto piccole, con nuclei piccolissimi (ancor più di quanto lo siano quelli dei micromeri fin qui considerati), compatti e scuri, che si scorgono solo per un certo periodo e che sono indice di una attività mitotica particolarmente intensa. Subito dopo la formazione delle due grandi cellule a vitello, il primo a dividersi, assieme ai micromeri, è un mesomero. L'ulteriore destino di mesomeri e macromero non ha potuto essere seguito con sicurezza. Tuttavia, a giudicare dalle dimensioni cellulari, si può arguire che, in seguito, dal gruppo dei mesomeri (o dal macromero?) si differenziano le tre cellule destinate ad un secondo annesso embrionale, interposto tra embrione e guscio esterno: il guscio interno, esso pure di natura sinciziale.

Cinque sono perciò le cellule che formano i gusci dell'oncosfera: due più grandi, i « blastomeri vitellini », in cui sembra essere rimasto accumulato tut-

to il vitello dell'uovo, per il guscio esterno, e tre, con citoplasma a granuli minuti, per quello interno, da cui molto più tardi, si originerà l'embrioforo (Fig. 2-B).

Considerando unicamente il numero e la posizione degli elementi cellulari che costituiscono i gusci embrionali, prescindendo cioè dal modo in cui venne descritta la loro origine e dal significato embriologico loro attribuito, possiamo dire che le osservazioni di St. Remy (1900) sugli *Anoplocephala* sono esatte (1). Pure molto precisa, eccezion fatta per i quattro nuclei del guscio interno, è la fig. 30, Tav. XIII, dell'uovo maturo di « *Taenia porosa* » di v. Beneden. Queste cellule erano state anche individuate dallo Spaetlich (1926) in *Diorchis inflata*, e stupisce che alla pubblicazione di questo A. non sia stata rivolta maggiore attenzione. Si può ora escludere che l'involucro a estremità affusate e contenente due nuclei delle uova di *Diorchis inflata* sia, come vorrebbe Lopez - Neyra (1943, p. 50 e 1947, p. 25), che lo ha pure osservato in *Diorchis acuminata* Clerc, 1902, una capsula uterina. Si tratta solamente del guscio esterno. Perciò il gen. *Diorchis* non ha nulla a che vedere con la s. fam. *Pseudohymenolepidinae* Joyeux e Baer, 1936, per la quale sono ammesse capsule uterine e nella quale lo vorrebbe sistemato il Lopez - Neyra (1944) (2).

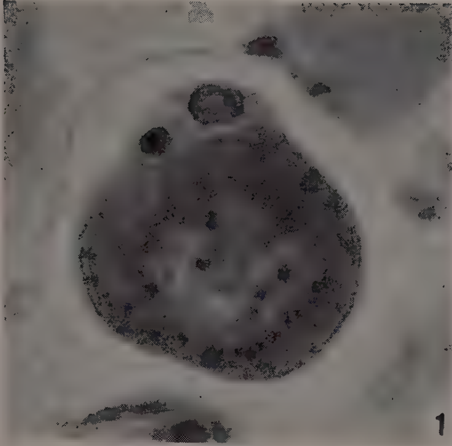
Ho potuto osservare una formazione dei gusci del tutto confrontabile a quella più sopra descritta anche in altre specie e in particolare in certi *Anomotaenia*. Il Lopez - Neyra (1951 e 1952), seguendo il medesimo criterio che lo indusse ad ammettere capsule uterine nel gen. *Diorchis* e in *Paricterotaenia porosa* (vedi oltre), ha diagnosticato la presenza di tali formazioni in parecchie *Anomotaenia*, tra cui la specie tipo, cosicchè la stessa definizione e posizione tassonomica del genere ne venivano modificate. Pur non avendo avuto occasione di esaminare le medesime specie, ritengo, dopo quanto si è detto, che le riforme del Lopez - Neyra riguardanti il gen. *Anomotaenia*, non siano accettabili, almeno fino a quando il materiale non verrà riesaminato alla luce delle nuove acquisizioni e tenendo presente la raccomandazione di Joyeux e Baer (1954) di non basarsi unicamente sulle descrizioni antecedenti, sovente incomplete e non prive di errori.

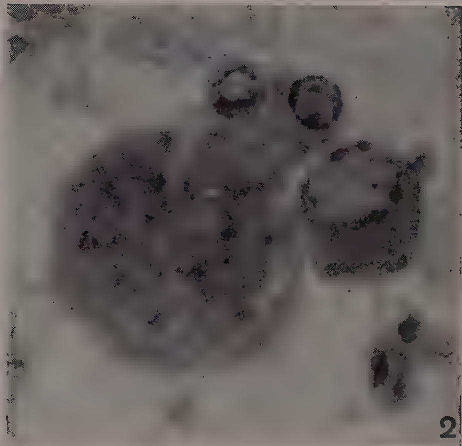
Con le osservazioni dello Spaetlich esistono ancora altri punti in comu-

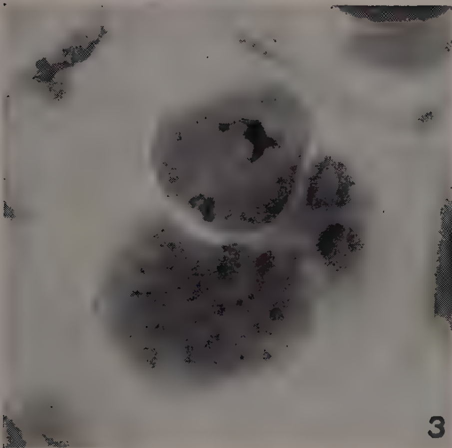
---

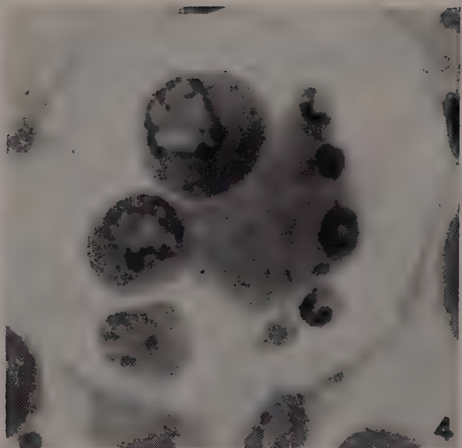
(1) St. Remy (1900), trattando degli *Anoplocephala*, considera come « vitellus » o « masse vitelline » quello che in realtà è l'uovo, e viceversa confonde l'uovo con la cellula vitellina. Così pure in *Taenia serrata* (1901) interpreta l'uovo come « cellule vitellophage » e la vera cellula vitellina come uovo.

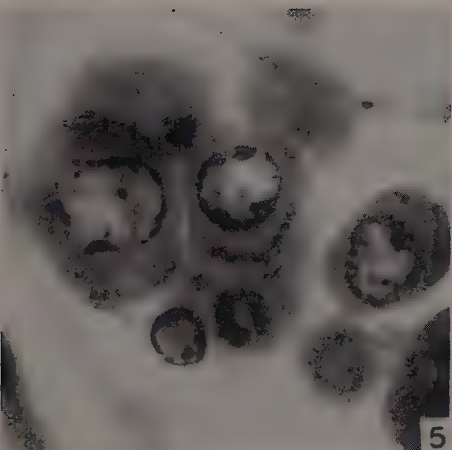
(2) Nel 1943 e 1947 (data di pubblicazione di un lavoro del 1934!) il Lopez-Neyra propone una s. fam. *Diorchinae*, ammettendo la presenza di capsule uterine nel gen. *Diorchis*, il che, come si è visto, non corrisponde a realtà. Nel « Compendio di Elmintologia Iberica » del 1944 (p. 444), che è in realtà più recente della pubblicazione del 1947, il medesimo Autore include il gen. *Diorchis* nella s. fam. *Pseudohymenolepidinae* Joyeux e Baer, 1936 mettendo in sinonimia la s. fam. *Diorchinae*.


1


2


3


4


5

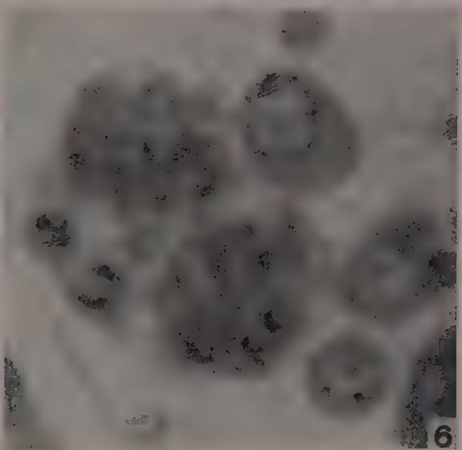

6

TAVOLA I.

Prime fasi di sviluppo dell'embrione di *Paricterotaenia porosa*.

(imm., × 1430)

1) Cellula uovo con I globulo polare affiancato alla cellula vitellina. La sottilissima « membrana vitellina » è già leggermente staccata dall'uovo.

2) Stadio di tre blastomeri. Nel blastomero vitellino si osservano le grandi zolle di vitello provenienti dall'uovo. Tra mesomero e micromero la cellula vitellina. Notare le differenze nel citoplasma e nel nucleo tra quest'ultima e il micromero.

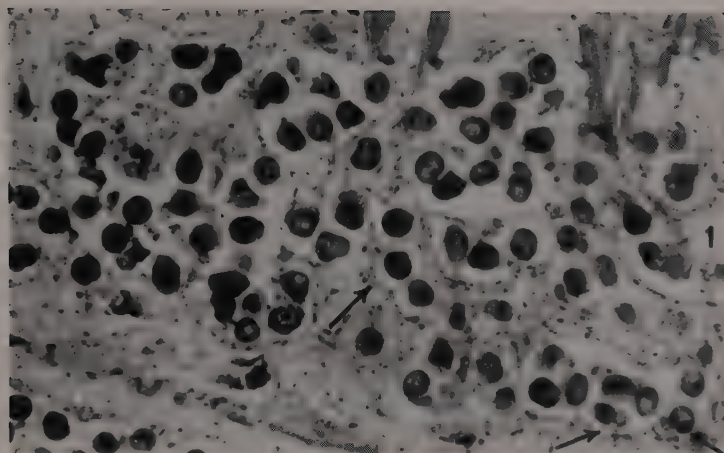
3) Divisione mitotica del primo mesomero. Sulla destra, sfocati, due micromeri.

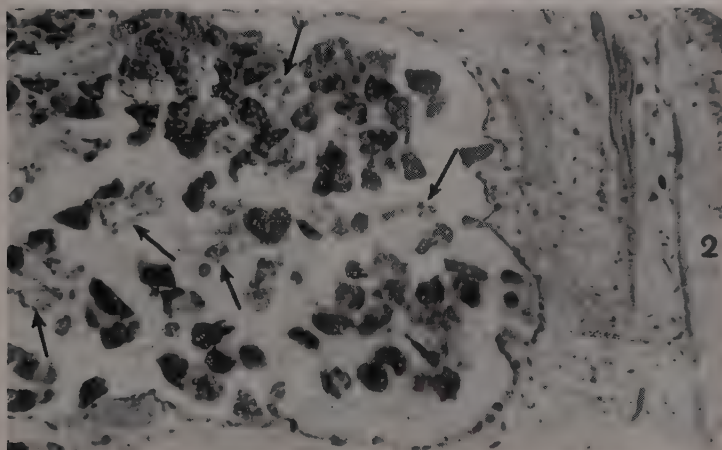
4) Stadio di otto blastomeri. Centrale e sfocato il blastomero vitellino: sulla sinistra i tre mesomeri ancora di grandezze diverse; sulla destra i tre micromeri. (Tra quello superiore e quello intermedio probabilmente il I globulo polare). Il macromero non è visibile perchè su di un piano focale diverso. Evidente la « membrana vitellina ».

5-6) Embrione allo stadio di nove cellule fotografato con due diverse messe a fuoco per mostrare tutti gli elementi di cui è composto. (Manca solo un mesomero situato al di sotto delle due cellule a vitello o « blastomeri vitellini » della fig. 6).

5) Macromero e un mesomero. In basso, sotto al mesomero e molto scuro, un micromero, e, sotto al macromero, il nucleo della cellula vitellina. Si scorgono le ombre dei due blastomeri vitellini e di un altro mesomero che sono stati messi a fuoco nella fig. 6. Sulla destra un mesomero di altro embrione.

6) I due blastomeri vitellini (con zolle vitelline) destinati al guscio esterno. In alto a destra un mesomero e a sinistra due micromeri di cui uno in procinto di dividersi. - In basso a destra un mesomero di altro embrione che non ha ancora raggiunto le dimensioni normali. Confrontarlo con il più piccolo dei mesomeri raffigurati nella fig. 4.


1


2

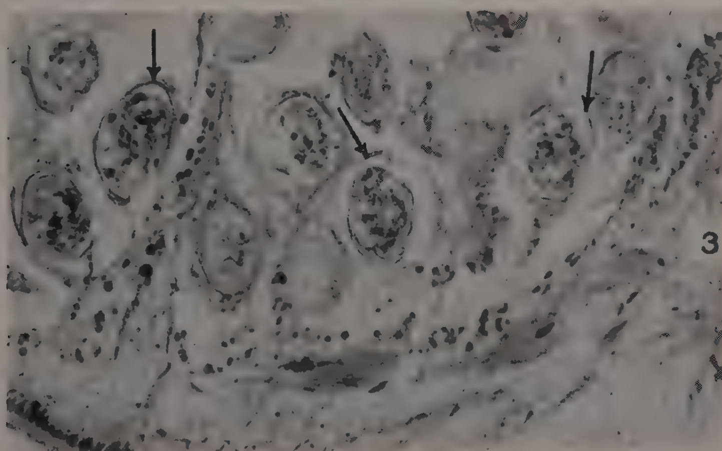

3

Tavola II.

Maturazione dell'utero.

(sezioni di 10 μ circa; x 155.)

1) Stadio iniziale con utero irregolare reticolare e ramificato. - In basso a destra due embrioni allo stadio di due cellule: il blastomero vitellino ed il I mesomero (frecce). Al centro tre uova in un tubulo stretto separate dalle rispettive « membrane vitelline » (freccia). - Parete uterina sottile. - (emallume/eosina).

2) Utero diventato sacciforme con residui di setti parenchimatosi, sempre rivestiti dall'epitelio della parete uterina (frecce). - Parete uterina ispessita rispetto allo stadio precedente. - (emallume/eosina).

3) Stadio finale con disgregazione degenerativa della parete uterina in masserelle intensamente colorabili. - Oncosfere quasi completamente mature con embriofori sottili (frecce) e ampi gusci esterni accartocciati che danno l'aspetto, in sezioni istologiche, di membrane aggrovigliate. - (Azan).

ne, specialmente sul numero e sull'aspetto di alcuni stadii iniziali di sviluppo embrionale, ma non sulla successione delle mitosi e sull'origine dei singoli blastomeri. Le discordanze con la descrizione dell'OGREN (1956) delle prime fasi di sviluppo dell'uovo di *Mesocestoides Corti* sono invece più numerose.

Va notato infine che nel gen. *Taenia*, se le osservazioni di v. BENEDEN (1881), ST. REMY (1901) e v. JANICKI (1907) — in gran parte concordanti sulla morfologia ma non sull'origine e sul significato degli elementi cellulari dei primi stadi di sviluppo — rispondono al vero, la formazione dei gusci, pur seguendo nelle grandi linee le tappe qui prospettate, presenta alcune differenze che potrebbero forse un giorno assumere significato tassonomico. Il guscio interno, che darà origine allo spesso embrioforo di struttura raggiata, sarebbe costituito da 3/5 cellule secondo v. BENEDEN e v. JANICKI e solo da 3 secondo ST. REMY, cellule che rimangono all'interno dell'embrioforo assieme a residui citoplasmatici. Non è chiaro se esista anche qui uno sdoppiamento del guscio interno (vedi oltre). Il guscio esterno sarebbe invece costituito da quattro cellule, anzi che da due, e precisamente da 3 cellule simili tra di loro e dalla grande « cellule granuleuse » di v. BENEDEN, interpretata da quest'ultimo come uno dei primi due blastomeri, da ST. REMY come derivata dalla « cellule embryonnaire principale » proveniente a sua volta direttamente dall'uovo, e da v. JANICKI come cellula vitellina. Per finire, sempre nel gen. *Taenia*, il guscio esterno si raggrinza e si disperde lasciando solo un embrioforo nudo molto robusto attorno all'oncosfera. (1)

Una discussione sulle conclusioni dei vari Autori è prematura, perchè sono ancora indispensabili ulteriori indagini a conferma delle affermazioni fatte e a completamento delle nostre conoscenze sull'argomento. Osservazioni ancora frammentarie mi inducono a pensare che almeno nei *Dilepididae* ed *Hymenolepididae* i due gusci propri dell'oncosfera siano costituiti dallo stesso numero e dallo stesso tipo di cellule qui descritte.

3) *Formazione dei gusci embrionali durante la maturazione dell'oncosfera.*

Guscio esterno. — Nei due grandi « blastomeri vitellini » del guscio esterno (*G*) che si sono espansi alla superficie della morula, i due nuclei e le masserelle di vitello conservano la posizione iniziale ai lati dell'embrione, formando due agglomerati compatti e sporgenti, mentre altrove lo spessore del sincizio rimane sottile (Fig. 2-B). Tale disposizione si manterrà a lungo, fino a quando i granuli di vitello, che si diradano molto lentamente, non siano completamente scomparsi per dissoluzione nel citoplasma sinciziale; il che si verifica dopo

(1) Ricordiamo che la « couche albuminogène » e la « couche chitinogène » di v. BENEDEN corrispondono rispettivamente alla « äussere Embryonalhuelle » e « innere Embryonalhuelle » di v. JANICKI.

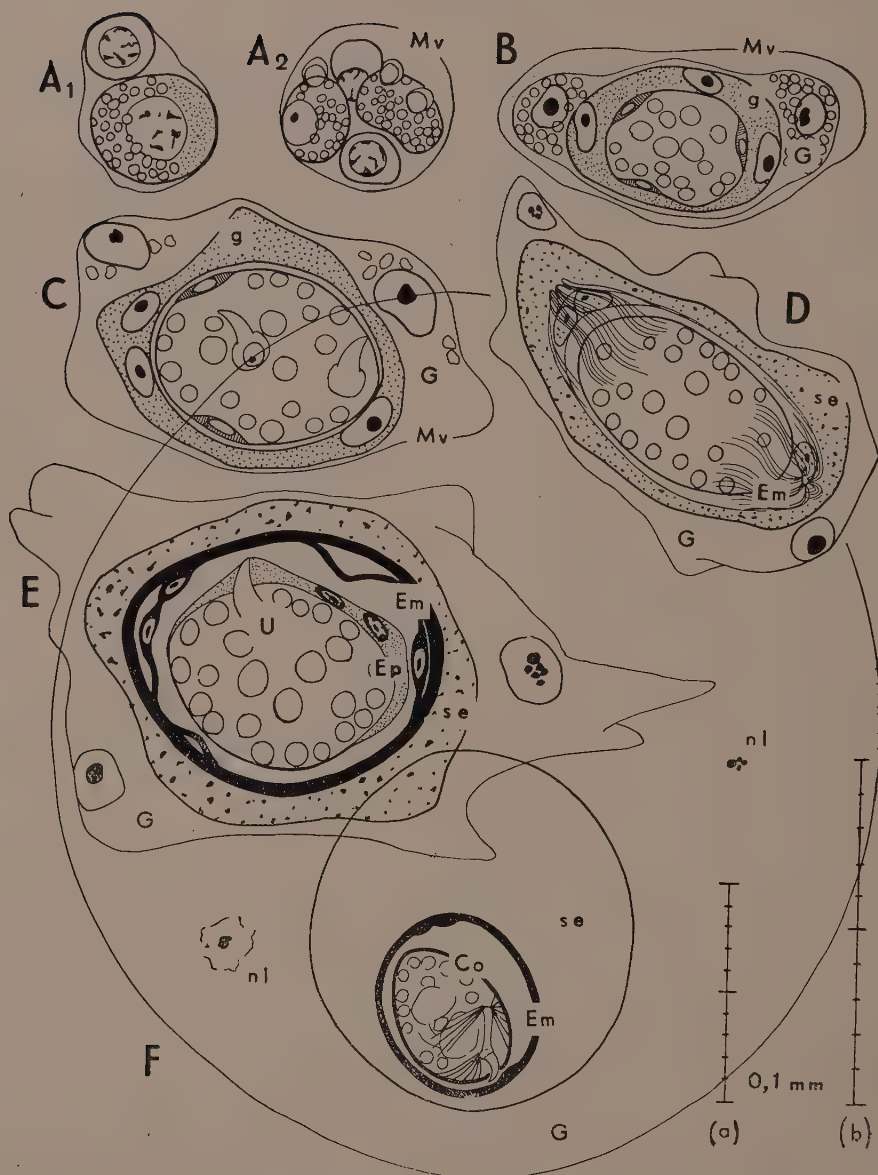


Fig. 2. — *P. porosa*. Formazione e modificazioni dei gusci embrionali.

A_1 : Blastomero vitellino e primo mesomero circondati dalla membrana vitellina.
A_2 : Morula allo stadio di 9 blastomeri con membrana vitellina e i due « blastomeri vitellini » del futuro guscio esterno.

B : Guscio esterno (sincizio bicellulare), con abbondanti sferule di vitello, e guscio interno (sincizio tricellulare), a citoplasma finemente granulare, all'inizio del loro sviluppo. La membrana vitellina è ancora staccata dal guscio esterno. Si nota l'epitelio proprio dell'embrione.

C : Guscio esterno con sferule vitelline quasi completamente disciolte e guscio interno, più ampio che in B, poco prima della formazione dell'embrioforo. La membrana vitel-

la comparsa del primo abbozzo di uncini e prima della formazione dell'embrioforo (Fig. 2-C). La membrana vitellina (*Mv*) da principio è assai distanziata dal guscio esterno e perciò facilmente individuabile (Fig. 2-B); in seguito, quando il vitello sta per scomparire, essa viene a contatto col guscio, tanto intimamente da non poterne più essere distinta come struttura indipendente (Fig. 2-C, D, E, F). Come già è stato detto al paragrafo III°-1, solo la sua metacromasia, la sua PAS-positività e l'affinità per il blu di anilina, che si intensificano col progredire della maturazione, permettono di metterla in evidenza e di riconoscerla come tale. Scomparse le masserelle vitelline, il citoplasma del guscio esterno rimane a granulazioni molto fini e poco colorabili in confronto a quelle più grossolane (forse per effetto di fissazione) del guscio interno. Il guscio esterno aumenta di volume, ma rimane, assieme alla membrana vitellina, accartocciato ed afflosciato attorno al guscio interno, il quale, pur ingrossato e deformato, mantiene un contorno meno frastagliato e più marcato. Nell'utero i gusci esterni contigui si compenetrano reciprocamente — senza perdere la propria individualità — e perciò i loro limiti sono difficilmente osservabili.

In sezioni istologiche gli embrioni sembrano immersi in un ammasso inestricabile di membrane contorte (Tav. II, fig. 3). Solo a contatto con l'acqua il guscio esterno raggrinzito gonfia enormemente diventando turgido, a superficie liscia e distesa, tanto da poter esser visto ad occhio nudo (Fig. 2-F). E' costituito perciò di una sostanza, non ancora individuata istochimicamente, che si imbeve fortemente e che permette all'oncosfera di rimanere sospesa nell'acqua diventando così un'esca più facile per l'ospitatore intermedio. In questa massa trasparente di apparenza gelatinosa rimangono a lungo visibili due nuclei (*nl*) o, se questi sono disfatti, due grossi nucleoli, ultima traccia delle cellule

---

lina si è addossata al guscio esterno e non compare più come struttura indipendente.

D: Inizio della differenziazione dell'embrioforo (affusato) in seno al guscio interno. I nuclei del guscio interno sono in posizione tipica ai lati dell'embrione e compare la fibrillatura ondulata trasversale.

E: Il guscio interno si è sdoppiato in embrioforo, verso l'oncosfera, ed in strato granuloso (privo di nuclei) verso il guscio esterno. Una pellicola, alla quale aderiscono i 3 nuclei del guscio interno, può staccarsi dal lato concavo dell'embrioforo. Epitelio embrionale ispessito nello stadio che precede la trasformazione in cuticola.

F: Oncosfera matura in acqua, a ingrandimento minore per necessità di spazio. Il guscio esterno, in cui si intravedono ancora gli avanzi dei due nuclei (nl), si è gonfiato e disteso enormemente. Il guscio interno compare sempre sdoppiato in embrioforo e in un'ampia fascia più esterna. Fibre muscolari annesse agli uncini si inseriscono alla cuticola dell'oncosfera.

Co: cuticola dell'oncosfera. - Em: embrioforo. - Ep: epitelio dell'oncosfera prima di trasformarsi in cuticola. - G: guscio esterno. - g: guscio interno. - Mv: membrana vitellina. - nl: avanzi dei nuclei dei « blastomeri vitellini ». - se: strato esterno del guscio interno. - U: uncino che solleva l'epitelio prima di perforarlo.

(a): scala micrometrica per la fig. F. - (b): scala micrometrica per tutte le altre figure.

formatrici (Fig. 2-F). Questo è un importante e caratteristico punto di riferimento quando si devono contare o interpretare gli involucri attorno all'oncosfera. Talvolta questi nuclei del guscio esterno sono stati creduti avanzi di cellule della parete uterina o di cellule parenchimatose e causarono per questo errate diagnosi di capsule ovifere.

La possibilità di ingrossare enormemente a contatto con l'acqua deve costituire, per il guscio esterno, un particolare adattamento all'ambiente acquatico in cui giungono queste oncosfere. In quelle invece che trascorrono il periodo di attesa dell'ospitatore intermedio sul terreno o in ambiente asciutto, sovente il guscio esterno diventa una sottile pellicola caduca. Già lo Spaetlich (1926) aveva fatto una osservazione analoga per le uova di *Diorchis inflata*. E' interessante notare che questo *Hymenolepididae, Choanotaenia* (?) *marchali* (*Dilepididae*) (1), (entrambe parassite di Ralli, ma senza particolari affinità sistematiche), e *Paricterotaenia porosa*, tutti e tre parassiti di uccelli acquatici, presentano un fenomeno di convergenza nello spessore ridotto dell'embrioforo e nel guscio esterno molto ampio e persistente.

Guscio interno ed embrioforo. — Lo spessore del guscio interno (*g*) aumenta rapidamente e le sue granulazioni ingrossano fino a diventare zolle ortocromatiche col blu di toluidina, giallastre con l'Azan e intensamente colorabili con l'emallume (Fig. 2-C). Il guscio interno, pur essendo ampio e fluido a questo stadio, è, come si è detto, meno deformabile del guscio esterno; le sue superfici limitanti (esterna ed interna) sono più consistenti. I suoi tre grandi nuclei (un po' più piccoli di quelli del guscio esterno), con vistosi nucleoli, si riconoscono facilmente.

I nucleoli di entrambi i gusci possiedono una sferuletta centrale rifrangente ed eosinofila, e uno spesso strato periferico pure eosinofilo, ma che si colora contemporaneamente con l'emallume. Essi sovente, a maturazione avanzata, si frammentano in un grappolo di nucleoli più piccoli.

Quando nell'embrione è quasi ultimata la formazione degli uncini e compaiono la metacromasia e l'affinità per il blu di anilina nelle grandi cellule ghiandolari di penetrazione, nel guscio interno, e precisamente dalla parte rivolta verso l'oncosfera, inizia la formazione dell'embrioforo (*Em*). I tre nuclei, spostandosi in una fascia interna di citoplasma assumono una posizione tipica, che diverrà d'ora in poi stabile: due, affiancati, si portano a un lato dell'embrione, e il terzo, isolato, dalla parte opposta (Fig. 2-C, D) (2). Esternamente a questi due gruppi di nuclei, si differenziano, nel citoplasma del sincizio, fi-

---

(1) Vedi Bona (1955-56).

(2) Una identica posizione dei tre nuclei del guscio interno ai lati dell'oncosfera l'ho potuta osservare in numerose altre specie.

lamenti molto esili, azzurri con l'Azan e siderofili con ematossilina ferrica, raggruppati in fasci ondulati che hanno origine nella zona perinucleare e si estendono trasversalmente tutt'attorno all'oncosfera. Questi fasci di filamenti fanno capo ad una prominenza crateriforme che incappuccia ciascuno dei due gruppi di nuclei, sicchè, inizialmente, l'abbozzo dell'embrioforo appare fusiforme. Queste prominenze bilaterali, di struttura simile, sembrano costituite dai filamenti stessi, i quali, originatisi come ciuffi indipendenti nelle adiacenze dei nuclei, si dirigono per un breve tratto verso l'esterno, per ripiegare poi su se stessi e ricoprire l'oncosfera (Fig. 2-D). Segue una rapida fusione dei filamenti in una superficie compatta, dapprima molto sottile, poi più spessa: l'embrioforo. Le aperture apicali dei coni laterali si obliterano e rapidamente la forma di questo involucro tende da fusiforme a farsi sferica. Il citoplasma a granulazioni grossolane rimasto all'esterno dell'embrioforo resta isolato dai nuclei e forma un vero e proprio involucro (*se*) attorno all'embrioforo. Non mi risulta che in embrioni anche molto maturi questo strato regredisca o si trasformi in embrioforo. Il guscio interno appare così sdoppiato (Fig. 2-E). Mentre in seno al sincizio si forma l'embrioforo, il limite del guscio rivolto verso l'embrione si ispessisce leggermente ed aumenta la sua colorabilità col blu di anilina. I nuclei restano così compresi tra due strati compatti che finiscono per combaciare strettamente; uno esterno, che si irrobustisce assai costituendo la parte principale dell'embrioforo, ed uno interno al quale aderiscono i nuclei, appiattiti ed in via di degenerazione. Le sezioni istologiche sovente provocano un distacco di questi due strati dell'embrioforo, il che dimostra, pur trattandosi di un artefatto, una certa discontinuità tra le due formazioni, tanto che un osservatore poco accorto potrebbe contare — con lo strato granuloso (*se*) — tre gusci, là dove in realtà si tratta di involucri differenziati a spese del solo guscio interno (Fig. 2-E).

Le proporzioni delle due parti del guscio interno — l'embrioforo (*Em*) e lo strato più esterno rimasto senza nuclei (*se*) — possono variare da una specie all'altra. Talvolta pare che tutto il guscio interno si trasformi in embrioforo, altre volte invece, come in *P. porosa*, in *Diorchis inflata* (vedi Spaetlich 1926), in *Choanotaenia* (?) *marchali* (vedi Bona 1955-56) e certi *Anomotaenia* di uccelli acquatici (1), lo strato esterno permane anche ad oncosfera completamente matura, simulando un guscio intermedio tra embrioforo e guscio esterno; salvo che, bene inteso, i processi di maturazione si protraggono fino a stadi sfuggiti all'investigazione, nei quali si verifichi la scomparsa o la trasformazione di questo strato. La cosa, tuttavia, dalle osservazioni che ho potuto eseguire, mi sembra molto improbabile. Fu precisamente questo strato granulare in *P. porosa* ad ingannare il Lopez-Neyra (1951). Egli lo considerò guscio e-

---

(1) Osservazioni personali.

sterno e finì, di conseguenza, per interpretare come capsula uterina l'ampio involucro successivo che è invece il vero guscio esterno.

Ritengo doveroso, a questo punto, citare v. BENEDEN (1881, pag. 202 e 203) che aveva fin da allora inquadrata con precisione la questione dei gusci delle uova di *P. porosa*. « Sous la *coque de l'oeuf* [= membrana vitellina] parfaitement sphérique se voient, à deux pôles opposés de la sphère deux noyaux de cellules... *Ces noyaux décèlent l'existence de deux cellules,* convexes d'un côté, concaves de l'autre... Elles représentent probablement les cellules albuminogènes du *T. serrata* et du *T. saginata;* par leur concavité elles se moulent sur une seconde membrane anhyste, marquée par un double contour aussi net que celui qui correspond à la coque. [Si tratta della parte esterna del guscio interno che l'A. denomina membrana anche se possiede un notevole spessore, come risulta dalla sua fig. 30, Tav. XIII]. Cette membrane délimite extérieurement *un espace assez étendu, absolument dépourvu de tout élément cellulaire* et rempli d'une subtance homogène. [Non è improbabile, infatti, che le granulazioni di questo strato da me citate siano dovute, almeno in parte, a un artefatto di fissazione]. Puis vient une *capsule ovoïde* [= embrioforo], formée d'une matière très refringente, et, *sous cette membrane, on trouve dans tous les oeufs quelques noyaux de cellules...* N'ayant pu étudier le développement de ces embryons, je ne puis établir de parallèle certain entre les enveloppes de l'embryon du *Taenia porosa* et celles des espèces précédemment étudiées; néanmoins l'examen de quelques stades jeunes, imparfaitement conservés, m'amène à penser que *les diverses membranes sous-jacentes à la couche albuminoïde sont engendrées par cellules qui, dans l'oeuf mûr, sont logées entre le capsule interne* [= embrioforo] *et l'embryon.* Si ces cellules sont homologues à la couche chitinogène du *T. serrata,* les deux membranes avec la substance homogène interposée [Probabilmente intende da una parte il limite esterno del guscio interno e dall'altra l'embrioforo] correspondraient à l'enveloppe chitineuse des Ténias étudiés plus haut. Dans les stades jeunes on ne voit aucune trace de la capsule interne et les noyaux se trouvent alors beaucoup plus éloignés de l'embryon... ».

Per quanto concerne la formazione dell'embrioforo e degli altri involucri, si può escludere l'ipotesi dell'OGREN (1955), secondo cui vi sarebbe un intervento delle ghiandole dell'oncosfera, la cui esistenza è stata accertata solo in questi ultimi anni (REID (1948) in *Davaineidae, Anophlocephalidae, Dipylidiinae,* ed *Hymenolepididae;* SILVERMAN (1954) in *Taeniidae;* OGREN (1955) in *Hymenolepididae;* BONA (1955-56) in *Choanotaenia* (?) *marchali*) e che mancherebbero invece, secondo OGREN (1956), in *Mesocestoides.*

Questi ammassi ghiandolari sono evidentissimi negli embrioni di *P. porosa;* sono doppi e ciascuno sbocca dorsalmente ad un uncino della coppia mediana con 5/6 dotticini escretori. Pur coincidendo l'inizio della formazione dell'embrioforo con la comparsa nelle cellule ghiandolari della metacromasia e

della colorabilità con il blu d'anilina dell'Azan (1), esse non partecipano alla formazione dei gusci per le seguenti ragioni:

1) Quando l'embrioforo si differenzia, esse non sono completamente mature, e cioè mancano di dotti escretori (il cui orifizio, nelle oncosfere racchiuse dai gusci, non ha potuto essere individuato neppure in vivo), e non hanno ancora raggiunto la mole definitiva e l'intensità massima di colorabilità.

2) Le fibrille di cui si è parlato si formano all'esterno dei nuclei del guscio interno il quale, inoltre, è separato dall'oncosfera da una superficie propria ben netta che sarebbe certamente di ostacolo al passaggio di un eventuale secreto.

3) Le fibrille prendono origine in posizione laterale rispetto all'oncosfera, mentre gli sbocchi delle ghiandole sono mediani.

4) L'embrioforo, pur avendo affinità per il blu d'anilina, non è metacromatico, mentre lo sono le ghiandole.

5) Anche se vi può essere emissione di secreto (non mai osservata in *P. porosa*) nello spazio compreso tra oncosfera e guscio interno, ciò avverrebbe molto tardi, quando tutti gli involucri sono ormai formati.

Bisogna aggiungere che in *Mesocestoides,* secondo lo stesso Ogren (1956), mancano queste ghiandole, mentre i gusci si formano ugualmente.

La funzione delle ghiandole dell'oncosfera, ammessa da Reid (1948) e dimostrata da Silverman e Maneely (1955), è quella di facilitare la penetrazione della larva attraverso la parete intestinale dell'ospitatore intermedio.

4) *Epitelio e cuticola dell'oncosfera.*

Dopo che le tre cellule del guscio interno si sono staccate dalla morula, alla superficie dell'embrione si forma un epitelio di cellule appiattite a citoplasma intensamente colorabile con emallume e blu di Toluidina. Esso rimane sottile fino alla completa formazione degli uncini ed alla differenziazione dell'embrioforo (Fig. 2-B, C, D). Quando in seguito gli uncini spuntano alla superficie dell'embrione, prima di perforarla, sollevano questo epitelio, sicchè la lama dell'uncino appare per breve tempo incappucciata da una tenue membrana. A questo stadio, non di rado, si osserva un fugace ingrossamento dell'epitelio (*Ep*) in cui compaiono fini granulazioni (Fig. 2-E). Con tutta probabilità è questo epitelio che lo Spaetlich (1926) ha definito 3° guscio interno. Successivamente esso diventa uno strato compatto, resistente e rifrangente, in cui non vi è più traccia di cellule o di nuclei epiteliali, e la lama degli uncini sporge libera all'esterno dell'oncosfera. Questa trasformazione dell'epitelio in spessa cuticola (*Co*) coincide con la comparsa nell'embrione delle fibre muscolari, di cui impor-

(1) Queste ghiandole sono pure intensamente PAS-positive.

tanti fasci hanno come punti di inserzione gli uncini e la suddetta cuticola (Fig. 2-F). Mentre con l'Azan l'embrioforo si colora intensamente in blu, la cuticola propria dell'embrione diventa bruno-giallastra.

E' interessante notare che la cuticola dell'oncosfera è costituita da un epitelio trasformato, e non dalla secrezione di particolari cellule sottocuticolari, come pare sia il caso nel cestode adulto.

5) *Utero e modificazioni della parete uterina.*

L'utero è formato inizialmente da un reticolo di tubuli a lume ampio e irregolare (possono contenere numerose uova in una sezione), disposti in tutte le direzioni e con numerose sacche e diverticoli. Si può definire reticolare ramificato. Ben presto questi spazi ingrossano diventando ampie cavità comunicanti, più gonfie verso l'esterno. Contemporaneamente il parenchima circostante si riduce a setti discontinui tra una sacca e l'altra o a cordoni dorso-ventrali contenenti anche fibre muscolari. Questi setti regrediscono progressivamente e scompaiono quasi del tutto col distendersi della parete uterina, e per finire l'utero si trasforma in una grande, unica cavità a contorno lobato, che occupa tutta la proglottide (Fig. 3).

Non vi è traccia di capsule uterine. Le cavità che contengono le uova non subiscono strozzature e, per un tratto assai lungo di proglottidi, la parete uterina, prima di degenerare, appare integra e con caratteristiche istologiche ben determinate. D'altronde, in qualsiasi stadio di maturazione si laceri la parete dell'utero, le uova fuoriescono facilmente e abbondanti, fatto che non si verifica quando esistono capsule ovifere. La proglottide gravida gonfia molto, forse per un principio di imbibizione dei gusci esterni, e si squarcia sui due lati mettendo in libertà le oncosfere.

Nell'utero giovane le cellule appiattite della parete costituiscono un epitelio sottile (Tav. II, fig. 1). Nel citoplasma si intravvede una finissima fibrillatura e spiccano delle zolle basofile affusate che diventano gradualmente sempre più evidenti.

Sulla faccia interna della parete uterina si osserva uno straterello sottilissimo di sostanza metacromatica, PAS-positiva e azzurra con l'Azan, sostanza che sembra una secrezione dell'epitelio, al quale talvolta aderiscono delle goccioline con le medesime affinità tintoriali, specialmente prima che siano giunte molte uova nell'utero. Le cellule stesse, per contro, non sono nè PAS-positive, nè metacromatiche.

Poi l'epitelio, se non è teso da una eccessiva pressione delle uova, si ispessisce leggermente, a tratti (Tav. II, fig. 2). I nuclei sono ovolari e compatti. Con le comuni tecniche istologiche non si scorgono limiti cellulari. Le zolle basofile iniziano un processo di vacuolizzazione, e sono disposte sul percorso delle fibrille, dando perciò l'impressione che le due strutture siano funzionalmente

connesse. La fibrillatura diventa più marcata, è continua da una cellula all'altra, e può assumere aspetti diversi: di reticolo fine e disordinato, di fasci orien-

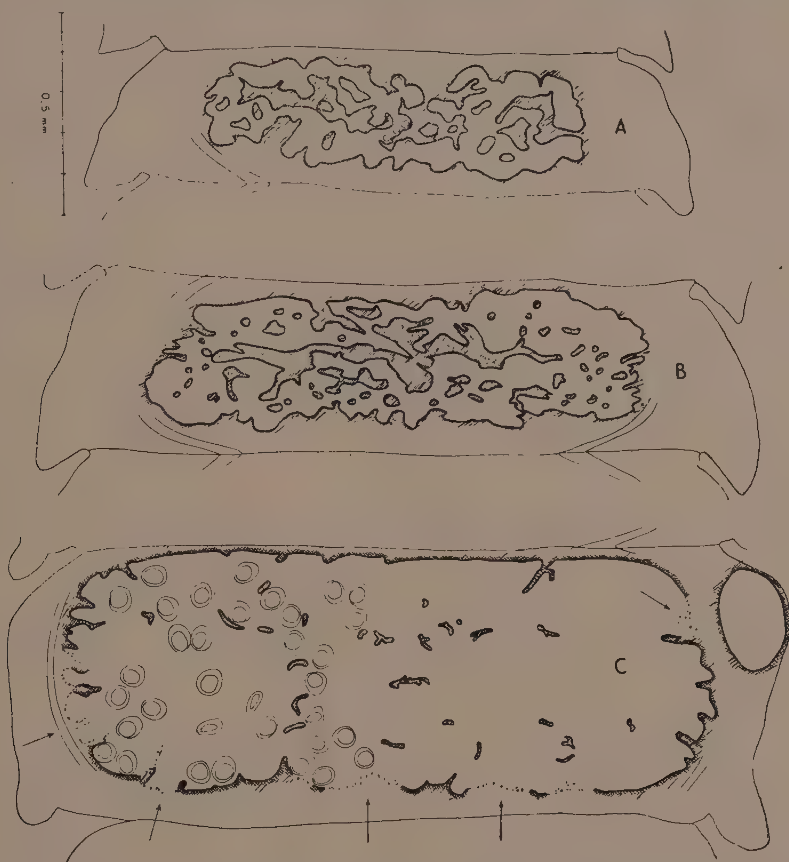


Fig. 3. — *P. porosa.* Maturazione dell'utero. Tre stadi successivi con graduale scomparsa del reticolo e dei setti. In C la cavità uterina sta spingendosi oltre i vasi escretori fin sotto la cuticola e la sua parete inizia il processo di degenerazione (frecce). In A e C sono disegnate alcune uova. (Schematizzato da sezioni).

tati e paralleli, di una successione lineare di granulazioni. In tal modo, la parete dell'utero, in una stessa proglottide, non ha struttura citologica uniforme.

A maturazione più avanzata, con l'emallume, si nota ancora qualche zolla allungata, tra le maglie o aderente alle fibrille, che ha perduto la sua basofilia. Quando nell'oncosfera compaiono gli uncini (1) la fibrillatura ha assunto il suo

(1) Questi riferimenti agli stadi di maturazione dell'oncosfera non hanno un significato di sincronicità assoluta tra sviluppo dell'embrione e trasformazioni della parete uterina, bensì servono solo come indicazione approssimativa del momento in cui tali trasformazioni avvengono.

massimo sviluppo, forma dei fasci relativamente grossi, tanto da simulare fibre muscolari, e la vacuolizzazione delle zolle si accentua. Poco dopo, e precisamente da quando inizia la formazione dell'embrioforo, l'epitelio entra in degenerazione e finisce con lo scomparire completamente. Scompaiono le fibrille, che vengono sostituite da vacuoli e da granuli, e l'epitelio si disgrega in sferule caratteristiche di varie dimensioni (Tav. II, fig. 3; Fig. 3-C) costituite da ammassi di granulazioni più o meno stipate, raramente isolate e sparse. Questi ammassi si colorano intensamente e in modo diffuso, col blu di toluidina in azzurro cupo, con l'Azan in rosso, e così pure presentano affinità per l'emallume e per l'eosina. Essi contengono uno o più nuclei, i quali, assai allungati fin tanto che esistevano fibrille, dal momento in cui l'epitelio perde la propria coerenza diventano rotondeggianti, di varia grossezza, con cromatina generalmente concentrata in poche grosse zolle o in un unico grumo compatto. Talvolta perfino si frammentano. La cromatina rimane Feulgen-positiva anche in questi stadii avanzati di degenerazione.

IV. Precisazioni morfologiche su *Paricterotaenia porosa* (Rud., 1810) e sinonimia con *Paricterotaenia gongyla* (Cohn, 1901).

Le più importanti ridescrizioni di *Paricterotaenia porosa,* cestode oramai ben conosciuto, sono quelle di Krabbe (1869), Cohn (1901) e Lopez - Neyra (1951) (1). Tuttavia è necessaria una ulteriore messa a punto.

La specie in questione è parassita molto comune, in Europa, nel *Larus ridibundus* L.. Ebbi però anche occasione di esaminare alcuni esemplari trovati in *L. argentatus* Pont. e *L. canus* L., catturati in Danimarca. L'abbondante materiale a mia disposizione proveniva dalle seguenti località: Torino, Salonicco, Spagna, Praga, Neuchâtel, Inghilterra, Danimarca.

I vermi sono lunghi 50/80 mm. e larghi fino ad un massimo di 2,4 mm. (proglottidi mature: 0,30/0,50 $\times$ 1/1,4 mm.; ultime proglottidi gravide: 0,75/0,90 $\times$ 1,7/2,4 mm.) (2). Se si esclude un primo tratto di giovanissime proglottidi che possono apparire allungate, forse per una trazione eccessiva subita durante il prelievo del verme, tutte le proglottidi sono più larghe che lunghe, anche in esemplari ben distesi.

---

(1) In Clerc (1903) e Young (1950) non si tratta di vere e proprie ridescrizioni, bensì di segnalazioni corredate da qualche dato numerico.

Sotto il nome di *Choanotaenia sp.*, Linton (1927) descrisse uno scolice appartenente, come già l'Autore stesso dubitò, a *porosa*. Misure e disegni permettono di riconoscere la specie con sicurezza.

Anche Joyeux e Baer (1954) forniscono alcuni dati su *P. porosa*.

(2) Le dimensioni maggiori sono di esemplari molto rilassati e ben distesi.



Fig. 6. — *P. porosa.* Proglottide matura poco prima della comparsa dell'utero.

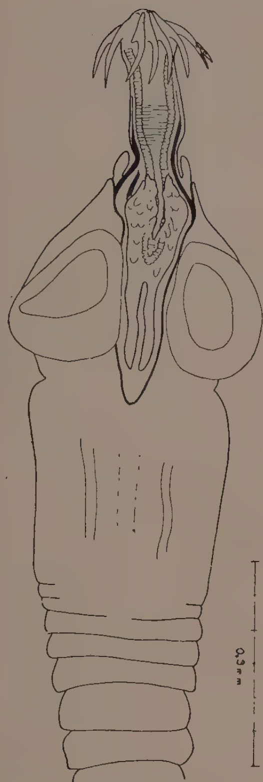


Fig. 4. *P. porosa.* Scolice con rostello non completamente estroflesso.

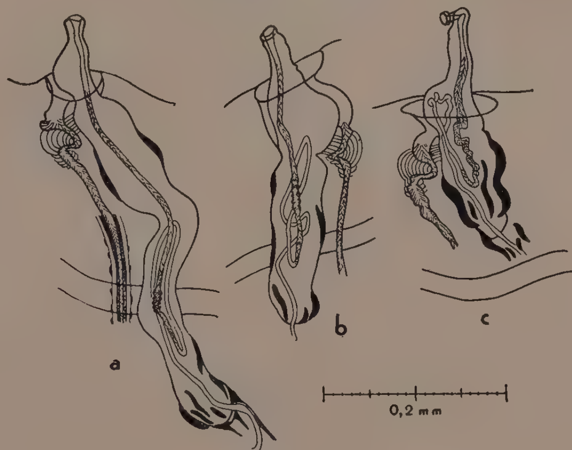


Fig. 8. — *P. porosa.* Tasche del cirro di varie dimensioni in proglottidi mature di uno stesso esemplare. *a* e *c*: aperture sinistre - *b*: apertura destra. (Tutte viste dorsalmente).

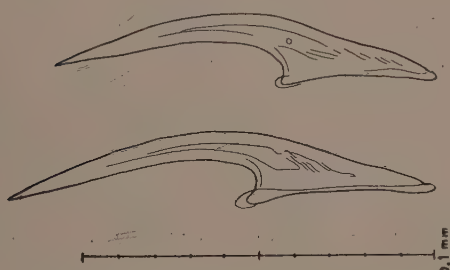


Fig. 5. — *P. porosa.* Uncini rostellari di due esemplari diversi provenienti dal medesimo ospitatore.

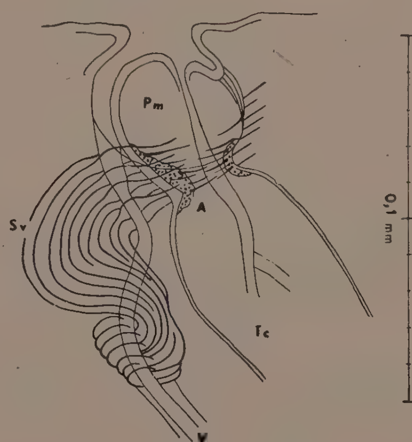


Fig. 7. — *P. porosa.* Sfintere vaginale e papilla atriale maschile. (Ricostruito da sezioni). A: anello muscolare che divide la tasca del cirro dalla papilla. - Pm: papilla. - Tc: tasca del cirro. - V: vagina. - Sv: fasci muscolari dello sfintere vaginale.

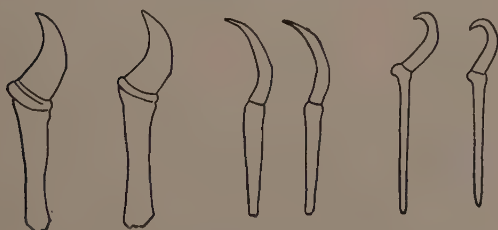


Fig. 9. — *P. porosa.* Uncini dell'oncosfera.

Lo scolice è appiattito, largo 310/360/430 μ (COHN: 500 μ; LOPEZ-NEYRA: 300/475 μ) e un solco poco marcato lo separa dal collo piuttosto corto e largo circa quanto lo scolice, tanto da conferire un aspetto tendenzialmente rettangolare e caratteristico alla parte anteriore del verme. Le prime segmentazioni avvengono in questo tratto, e solo in seguito le proglottidi si assottigliano notevolmente (Fig. 4).

Il rostello completamente estroflesso è lunghissimo: 420 × 70/90 μ, e così pure la tasca del rostello: 360/432 × 106 μ che oltrepassa il margine posteriore delle ventose. Il cuscinetto muscolare che porta gli uncini è anch'esso molto lungo: 290/375 × 63/67 μ, è striato trasversalmente e può presentare dei restringimenti dovuti a contrazioni. I muscoli retrattori contenuti nella tasca sono potenti. Tra l'altro, si individuano facilmente, quando non sono troppo contratti, quattro grossi cordoni longitudinali, due dorsali e due ventrali, che percorrono la parte posteriore della tasca e si applicano alla parte prossimale del cuscinetto porta-uncini, attorno al quale si fondono per un breve tratto formando un manicotto.

Gli uncini sono 14, disposti in corona semplice, e lunghi 108/124 μ (lama: 63/70 μ; manico: 66/55 μ) (KRABBE: 110/120 μ; COHN: 110 μ; LOPEZ-NEYRA: 105/125 μ; JOYEUX e BAER: 108/112 μ). Questa variabilità (1) si riscontra anche nei vermi di una stessa popolazione, cioè provenienti da un unico ospitatore. Nell'ambito di una medesima corona però la variabilità massima di lunghezza non supera i 4 μ. Come accade in altre specie, la guardia possiede un cappuccio trasparente, piuttosto delicato, di ampiezza variabile e non sempre presente nei preparati, per cui nelle misurazioni della lunghezza del manico non ne è stato tenuto conto. In certi esemplari della collezione dell'Istituto di Zoologia di Neuchâtel, l'estremità della lama è leggermente flessa all'infuori, ma la forma sostanzialmente non cambia da quella qui raffigurata (Fig. 5).

Le ventose possono essere triangolari ad angoli smussati od ovolari: 160/*173*/*187*/200 (230) × 190/*145*/ (115) μ. (COHN: 200 μ; LOPEZ-NEYRA: 230/170 × 150/160 μ) (2).

Su di un tratto di circa 400/600 μ, da metà ventose alle prime proglottidi, la cuticola è ricoperta da finissime spinule che decrescono rapidamente. Le ventose però ne sono prive.

Le aperture genitali sono irregolarmente alterne, ma possono verificarsi alternanze regolari anche per 12-17 proglottidi successive, mentre l'unilateralità è meno estesa: fino ad un massimo di 6 proglottidi.

---

(1) Sono stati misurati 70 uncini di 15 vermi.

(2) Le dimensioni tra parentesi sono eccezionali.

L'ovario, a completa maturazione, è molto voluminoso e massiccio tanto che le due ali si incontrano anteriormente, sulla linea mediana.

I testicoli sono posteriori all'ovario, sebbene qualcuno, specialmente quando la proglottide è contratta, possa addossarvisi lateralmente e, quando l'ovario ha raggiunto la massima estensione, possa sovrapporsi al suo margine posteriore. Sono stipati e disposti in non più di 3/4 file trasversali quasi sempre accavallate. Il loro numero varia da 18 a 31 (esemplari di Torino: 23/30; dell'Inghilterra: 19/20; della Danimarca: 18/31). Esso risulta perciò un po' inferiore a quello dichiarato da COHN: 40/50, e da LOPEZ - NEYRA (1951): 36/48, mentre praticamente coincide con i dati di JOYEUX e BAER: 15/35, e di YOUNG: 20/30. Il diametro, nelle proglottidi completamente mature, si aggira sugli 80/95 $\times$ 63/80 μ (LOPEZ - NEYRA: 50/70 $\times$ 35/40 μ). Da notare che il diametro dei testicoli varia con lo stato di contrazione del verme e col fissativo usato; in particolare diminuisce con le miscele a base di acido acetico.

I dotti genitali sono compresi tra quelli escretori. Esistono i vasi escretori trasversali.

La vagina è posteriore alla tasca del cirro, ha tutta la superficie interna ricoperta di cilia — più lunghe nella porzione distale — e possiede, prima di sboccare nell'atrio, uno sfintere complesso. Si tratta di due strati di fibre muscolari, l'uno dorsale e l'altro ventrale rispetto ai dotti genitali, con inserzione sulla parete anteriore dell'atrio e diretti posteriormente, i quali passano davanti alla tasca del cirro e finiscono per attorcigliarsi con doppia spira attorno al tratto terminale della vagina. Il fascio ventrale è quello più sviluppato. In tal modo, attorno alla vagina, si forma uno sfintere, che nella parte distale, in corrispondenza della prima spira, è formato da una massa eccentrica rivolta all'indietro, mentre nella parte prossimale, in corrispondenza della seconda spira, si continua con un manicotto molto meno spesso (Fig. 7). La contrazione di questo muscolo provoca la comparsa di tre flessioni caratteristiche nel tratto di vagina da esso controllato (Fig. 6 e 8). Tali incurvamenti possono essere tanto stretti e ravvicinati da provocare la chiusura della vagina. La parete della vagina è costituita da due strati; uno interno, più compatto, striato trasversalmente, che porta le cilia, ed uno esterno, meno intensamente colorabile, attorno al quale sono disposti, appiattiti, i nuclei (Fig. 8a). Poco prima di giungere al recettacolo seminale la vagina si restringe bruscamente e perde lo strato ciliato. Un esile e breve dotticino, costituito dal proseguimento dello strato esterno coi suoi nuclei, la congiunge al recettacolo seminale.

L'atrio, piuttosto piccolo (50 $\times$ 50 μ circa), è quasi completamente occupato da una papilla asimmetrica, a parete posteriore molto più sviluppata di quella anteriore, su cui sbocca il dotto eiaculatore. La papilla contiene un tessuto che è in continuazione con quello della tasca del cirro, dalla quale rimane separata da un anello muscolare proprio che provoca una strozzatura a livello del-

la sottile parete dell'atrio (Fig. 7). Quando il cirro viene estroflesso, la papilla si dilata e forma la base rigonfia ed eccentrica del cirro, nella quale può insinuarsi qualche ansa del dotto eiaculatore (Fig. 8). Questa porzione può occludere l'apertura vaginale o essere proiettata al di fuori dell'atrio conferendo al cirro un aspetto clavato caratteristico, riconoscibile anche a piccolo ingrandimento.

Il cirro è delicato e perde facilmente le finissime setole di cui è rivestito. Data la loro caducità, queste strutture si osservano meglio in porzioni di cirro ancora invaginate nella tasca.

La tasca del cirro è molto contrattile, e perciò di lunghezza eccezionalmente variabile: da 115 μ a 650 μ! (vedi specchietto pag. 179 e Fig. 8). Può oltrepassare di molto i vasi escretori longitudinali (spingendosi talvolta fin oltre il gomitolo del deferente) oppure non raggiungerli affatto. Nel suo interno il dotto eiaculatore, assieme al cirro introflesso, è più o meno contorto; quando è ben distesa ed oltrepassa i 500 μ, l'assieme dei dotti è quasi rettilineo (1). La sua parete può essere sottile o, a tratti, notevolmente ispessita, (Fig. 8), a superficie liscia o corrugata, tanto trasversalmente quanto longitudinalmente, secondo il grado di contrazione. Non sempre, perciò, compare la muscolatura, che è in realtà assai sviluppata e forma talvolta un manicotto che stringe la tasca a circa metà lunghezza. Il muscolo retrattore è ora molto lungo e sottile, ora ridotto a un ciuffo di fasci tozzi e brevi inseriti esternamente al fondo della tasca stessa.

Particolare attenzione va rivolta alla variabilità delle dimensioni della tasca del cirro di *P. porosa,* non solo perchè rappresenta un fatto di entità eccezionale e chiarisce definitivamente la sinonimia con *P. congyla* (Cohn) (vedi oltre), ma perchè dimostra quanto possa essere infido uno degli elementi comunemente usati nella diagnosi specifica. Nello specchietto seguente sono riportate le misure, effettuate personalmente su 12 esemplari di *P. porosa* provenienti da 7 località diverse. Nel medesimo verme possono verificarsi differenze di 300 μ tra una tasca e l'altra. In vermi diversi una tasca può essere fino a 5/6 volte più lunga di un'altra da 115 μ a 650 μ).

L'oncosfera possiede tre paia diverse di uncini, disposti secondo lo schema seguente: $\frac{a}{b}\ cc\ \frac{a}{b}$ che si ritrova in un grandissimo numero di specie (Bona, 1955 - 56) (2). Le rispettive dimensioni sono per *a,* 32/35 μ, per *b,* 31/33 μ, per *c,* 29/31 μ (Krabbe: 31/34 μ; Lopez - Neyra: 31/36 μ) (Fig. 9).

---

(1) Se si misurano tutte le circonvoluzioni del dotto eiaculatore e del cirro introflesso si vede che il loro sviluppo si aggira sui 600 μ, per qualsiasi lunghezza della tasca del cirro.

(2) Alcune osservazioni sulla morfologia degli uncini embrionali sono state di recente pubblicate anche da Hwang e Kates (1956).

	Provenienza	
Collezione LOPEZ-NEYRA	Valadolid (Spagna)	185/230 x 30/40 μ
	dichiarato da LOPEZ-NEYRA (1951)	110/225 x 70/90 μ
Collezione Istituto Zoologico Univ. Neuchâtel	Salonicco	290 x 33/42 μ
	Parigi	**600/650** x 42/30 μ 440/480 x 35/57 μ
	Neuchâtel	115/175 x 50/40 μ
	N° 42/67	300/340 x 40 μ
	N° 37/22	145/290 x 50/45 μ
	dichiarato da JOYEUX e BAER (1954)	413 x 34/36 μ
Collezione personale	Torino	**130/440** x 60/35 μ **115/290** x 70/50 μ
	Inghilterra	**330/533** x 25/40 μ (1)
	Danimarca	200/290 x 52/49 μ 115/245 x 72/57 μ

Per l'embrione ed i suoi gusci si hanno i seguenti dati: oncosfera, 69/78 × 50/60 μ ; embrioforo, 75/95 × 63/72 μ; strato più esterno del guscio interno, 144/175 × 115/175 μ ; guscio esterno, 330/450 μ (2). Volendo confrontare queste cifre con quelle del LOPEZ - NEYRA (1951) dobbiamo tener presente che la sua « capsula uterina » corrisponde al guscio esterno, e la sua « cubierta externa » alla parte periferica del guscio interno. Egli indica: per l'oncosfera, 68/82 × 66/54 μ ; per l'embrioforo, 74/86/91 × 62/72 μ ; per la « cubierta externa », 125/190 × 85/105 μ; per la « capsula uterina », 400/210 × 250/200 μ . Come si vede, vi è buona concordanza numerica.

Sinonimia con Paricterotaenia gongyla (Cohn, 1901). — Nessuno degli elementi morfologici indicati dal COHN (1901) è sufficiente per distinguere *P. gongyla* da *P. porosa*. Analizziamoli in dettaglio:

1) Ventose rotonde e non triangolari, di soli 150 μ anzichè di 200 μ . Ventose rotonde e di diametro inferiore ai 200 μ si trovano anche in *P. porosa*.

---

(1) Questa variazione di larghezza è stata riscontrata talvolta in una unica tasca dato un frequente rigonfiamento prossimale presente nelle tasche del cirro di *P. porosa*.

(2) Uova in glicerina (vedi § II su Materiale e metodi) o in formolo al 5 % non schiacciate, cioè con vetrino copri-oggetto tenuto sospeso ai quattro angoli da un po' di vasellina.

2) Uncini lunghi solo 103 μ. In *P. porosa* i minimi osservati sono 105 μ (LOPEZ-NEYRA) e 108 μ (JOYEUX e BAER; osserv. pers.). La differenza perciò non giustifica due specie.

3) Muscolatura longitudinale più potente in *P. gongyla*. Il maggiore o minore sviluppo della muscolatura varia da un esemplare all'altro secondo lo stato di contrazione del verme e il ritardo nella fissazione, tanto che nei preparati esaminati la muscolatura longitudinale può passare inosservata o comparire in fasci numerosi e robusti.

4) Deferente che sconfina in due punti nella zona corticale oltre lo strato interno della muscolatura. Si tratta certamente di un caso aberrante, da me osservato una volta anche in *P. porosa*, e che non può avere carattere di specificità.

5) Cirro con rigonfiamento basale. Quando il cirro è estroflesso, tale particolare si nota in tutti i *P. porosa*.

6) Tasca del cirro molto meno sviluppata che in *P. porosa*: 150 μ contro 550 μ. Anche questo dato, che dovrebbe essere il più importante, non ha valore, perchè entrambe queste dimensioni rientrano nei limiti di variabilità di una specie (vedi specchietto a pag. 179). In uno stesso esemplare di *P. porosa* ho notato dimensioni massime e minime della tasca del cirro (130 μ e 440 μ) che si avvicinano assai a quelle fornite da COHN per le due specie.

D'altra parte è comprensibile come COHN (p. 364) abbia osservato che nella tasca del cirro di *P. gongyla* « Das Vas deferens bildet in ihm noch mehrere Schlingen und tritt dann in den Cyrrhus selbst ein... », poichè effettivamente, anche in *P. porosa*, quando la tasca del cirro è corta, il dotto eiaculatore è molto più contorto, per ragioni di spazio, che non nelle tasche ben distese.

P. gongyla è perciò sinonimo di *P. porosa*, come già ebbe a sostenere il LOPEZ-NEYRA (1951). La sua affermazione però fu basata sulla supposizione che la lunghezza di 550 μ fornita da COHN per la tasca del cirro di *P. porosa* fosse errata, e che le reali dimensioni fossero di 110/225 μ, entro cui cadono i 150 μ dichiarati dal COHN per *P. gongyla* (1).

Riguardo alla sinonimia di *Paricterotaenia stercoraria* (Baylis, 1919) e *P. porosa* (Rud., 1810), sostenuta dal LOPEZ-NEYRA (1951) e negata da JOYEUX e BAER (1954), devo associarmi al parere di questi due ultimi Autori. Infatti gli uncini delle due specie, pur avendo lunghezze similari, differiscono nella forma; in particolare il rapporto tra la lunghezza della lama e del manico è maggiore in *P. porosa*, il che equivale a dire che il manico è relativamente più lungo in

---

(1) JOYEUX e BAER (1954) mantengono ancora separate le due specie e pensano che gli esemplari descritti da LOPEZ-NEYRA (1951), date le dimensioni modeste della tasca del cirro, appartengano a *P. gongyla* piuttosto che a *P. porosa*. Ad ogni modo la questione è ora superata.

P. stercoraria. Le proglottidi mature sono sempre più larghe che lunghe in *P. porosa*, mentre pare, dalla fig. 7 del BAYLIS, che in *P. stercoraria* vi sia una tendenza inversa. Anche nell'anatomia esistono differenze: in *P. stercoraria* il campo occupato dai testicoli, in confronto all'estensione dell'ovario, è molto maggiore; i testicoli sono meno ammucchiati, disposti su 6/8 file trasversali anzichè solo su 3/4 come in *P. porosa*, e sono anche più numerosi (circa 40, contro 18/31). Una differenza essenziale risiederebbe nell'utero che in *P. stercoraria* pare non sia ben definito (probabilmente è reticolare a tubuli sottili), rimanendo le uova sparpagliate nel parenchima. BAYLIS precisa che l'utero non è sacciforme. Ciò fa pensare che la specie suddetta appartenga al gen. *Choanotaenia*, ma in mancanza di una ridescrizione adeguata ogni conclusione in merito è prematura.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

1) La diagnosi di capsula uterina uniovulare, tanto importante per la classificazione dei Dilepididae, richiede in primo luogo che vengano riconosciuti i diversi gusci attorno all'oncosfera, per evitare di confondere questi con quella e per interpretare correttamente le modificazioni dell'utero.

2) La formazione dei gusci embrionali è stata perciò studiata in *Paricterotaenia porosa* a cominciare dalle prime segmentazioni dell'uovo (di cui sono descritte le fasi iniziali di sviluppo) per trovare un criterio morfologico generale di valutazione.

3) In *P. porosa* l'uovo appena giunto nell'utero viene avvolto, assieme allo spermio e alla cellula vitellina, dalla cosiddetta « membrana vitellina » (« coque », « Eischale », « shell », « chorion » e, impropriamente, « capsule ») molto sottile ma resistente, alla cui formazione partecipano la stessa cellula vitellina e probabilmente il secreto uterino. Questa membrana è omologa allo spesso guscio opercolato degli Pseudofillidei e dei Trematodi.

4) Le prime divisioni dell'uovo sono profondamente disuguali. Allo stadio di 9 blastomeri si notano: 1 macromero, 3 mesomeri, 3 micromeri e 2 grosse cellule contenenti apparentemente tutto il vitello dell'uovo e dette « blastomeri vitellini ».

5) I 2 blastomeri vitellini si spostano ai lati dell'embrione e, fondendosi in un sincizio, formano il guscio esterno.

6) Il guscio interno, compreso tra embrione e guscio esterno, trae origine, più tardi, da tre cellule provenienti dal gruppo macromero-mesomeri, che formano infine esse pure un sincizio.

7) Il guscio esterno, ingrossando, viene a contatto con la « membrana vitellina », la quale vi aderisce intimamente, tanto da non poter più essere riconosciuta e neppure isolata come struttura a sè.

8) I nuclei del guscio interno assumono una posizione laterale caratteristica rispetto all'embrione: uno da una parte e due, affiancati, dall'altra.

9) Più tardi il guscio interno si sdoppia: in uno strato verso l'oncosfera, compatto e rifrangente, che è l'embrioforo, e all'interno del quale si intravvedono i resti dei nuclei, e in uno strato ampio, deformabile, granulare e senza nuclei verso il guscio esterno. Questo aspetto può facilmente trarre in inganno: più di una volta si considerò come guscio esterno la parte periferica del guscio interno e di conseguenza il vero guscio esterno fu scambiato per capsula uterina.

10) L'epitèlio dell'oncosfera si trasforma in spessa cuticola sulla quale si inseriscono le fibre muscolari embrionali.

11) Il guscio esterno, che nell'utero è accartocciato, quando viene a contatto con l'acqua si rigonfia enormemente.

12) L'utero di *Paricterotaenia pòrosa*, inizialmente reticolare, diventa sacciforme e non si risolve in capsule uterine.

13) La parete dell'utero, costituita da un epitelio semplice percorso da fibrille citoplasmatiche, subisce, a maturazione avanzata, una degenerazione caratteristica.

14) Il genere *Paricterotaenia*, non possedendo capsule uterine, contrariamente al parere del Lopez-Neyra, non è sinonimo di *Choanotaenia* e resta valido con la definizione originale del Fuhrmann.

15) Nel genere *Diorchis* l'involucro esterno dell'oncosfera non è una capsula uterina, come vorrebbe il Lopez-Neyra, ma bensì il guscio esterno, come era stato a suo tempo descritto dallo Spaetlich, e perciò non vi è ragione di sistemare tale genere nella s. fam. Pseudohymenolepidinae.

16) L'utero degli *Anomotaenia*, contrariamente all'interpretazione datane dal Lopez-Neyra, non si risolve in capsule uterine.

17) Viene ridescritta *P. porosa*, precisando la variabilità degli uncini rostellari, la eccezionale contrattilità e conseguente variabilità della tasca del cirro (da 115 a 650 μ !) e varie altre particolarità dell'apparato riproduttore.

18) Riguardo ai sinonimi di *P. porosa* proposti dal Lopez-Neyra, viene confermata su nuove basi la sinonimia con *P. gongyla* (Cohn) ed esclusa invece quella con *P. stercoraria* (Baylis).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1) The diagnosis of uterine capsule with a single egg, a matter of importance for the classification of Dilepididae, requires, first of all, the identification of the onchosphere's various envelopes, that they may be distinguished from an actual capsule, and the uterus modifications be correctly understood.

2) The formation of the embryonal envelopes has been studied in *Paricterotaenia porosa* starting from the first segmentations of the egg (whose initial developemental stages are here described) in order to find a general morphological pattern of valuation.

3) In *P. porosa* the egg , when arriving in the uterus, is surrounded, as well as the sperm and the yolk cell, by the so called «yolk membrane» («coque», «Eischale», «shell», «chorion» and, improperly cold, «capsule»), which is very thin, firm and derives from the yolk cell itself and — probably — from the uterine secretion. This membrane is homologous with the thick operculated egg-shell of Pseudophyllidean Cestodes and Trematodes.

4) The first divisions of the egg are remarkably unequal. At the stage of 9 blastomeres there are: 1 macromere, 3 mesomeres, 3 micromeres and 2 large cells, apparently containing the egg's whole yolk and called therefore by the A. «yolk blastomeres» in accord with Spaetlich's (1926) definition.

5) Both yolk blastomeres displace themselves at the two sides of the embryo, joining to make a syncithium, and lastly form the external envelope of the egg.

6) Later on the internal envelope of the egg, enclosed between the embryo and the external envelope, has its origin from three cells deriving from the macròmere (?) mesomeres group, which join into a syncithium as well.

7) The external envelope grows larger and comes into contact with the «yolk membrâne» to which it adheres so tightly, that it cannot be either identified or isolated any longer.

8) The nuclei of the internal envelope are finally located in a characteristic position at two sides of the embryo: one at one end, and two — side by side — at the other end.

9) Later on the internal envelope splits into two layers: the embryophore, a compact and refracting layer on the side of the onchosphere, and a large, deformable and granular layer without nuclei on the side of the external envelope. Their appearance can be easily misleading, indeed the peripheric part of the internal envelope has often

been looked upon as an external envelope, hence the true external envelope has been mistaken for the uterine capsule.

10) The epithelium of the onchosphere developes into a thick cuticula, into which the embryonal muscular fibres insert themselves.

11) The external envelope, which is shrunken in the uterus, swells considerably when it touches the water.

12) The uterus of *P. porosa*, reticular at the beginning, becomes sacklike and does not develop into any uterine capsules.

13) The uterus wall, consisting of a simple epithelium with slender cytoplasmic fibrillae, undergoes a characteristic degeneration when it has attained full ripeness.

14) As it has no uterine capsules, genus *Paricterotaenia* is not a synonym of *Choanotaenia* as claimed by LOPEZ-NEYRA; therefore FUHRMANN's original definition is still valid.

15) In genus *Diorchis* the external wrapper of the onchosphere is not a uterine capsule, as maintained by LOPEZ-NEYRA, but it is the external envelope, as SPAETLICH had affirmed a long time ago; therefore there is no need to arrange this genus in subfam. Pseudohymenolepidinae.

16) The uterus of *Anomotaenia* does not develop into uterine capsules as LOPEZ-NEYRA had interpreted.

17) *P. porosa* is here described once more. Stress is laid on the variability of the rostellar hooks, the extraordinary contractility and consequent variability of the cyrrhus pouch (115-650 μ !) and on some other peculiarities of the genital apparatus.

18) As regards the synonyms of *Paricterotaenia porosa* proposed by LOPEZ-NEYRA the synonymy with *Paricterotaenia gongyla* (Cohn) is confirmed on a new basis, and the synonymy with *Paricterotaenia stercoraria* (Baylis) is rejected.

BIBLIOGRAFIA

BAER J. G. (1954): Révision taxinomique et étude biologique des Cestodes de la famille des Tetrabothriidae parasites d'Oiseaux de haute mer et de Mammifères marins. *Mem. Univ. Neuchâtel - Série in-quarto, T. 1*, 123 p.

BAYLIS H. A. (1919): A Collection of Entozoa, chiefly from Birds, from the Murman Coast. *Annals and Magazine of Nat. Hist., 3, ser. 9*, 501-515.

BONA F. V. (1955-56): Istologia delle capsule uterine di *Choanotaenia marchali* (Mola, 1907) e considerazioni sul genere *Monopylidium* Fuhrmann, 1899. (Cestoda, Dilepididae). *Boll. Ist. Mus. Zool. Univ. - Torino 5.*

CLERC W. (1903): Contribution à l'étude de la faune helminthologique de l'Oural. *Rev. Suisse Zool., 11*, 241-368.

COHN L. (1901): Zur Anatomie und Systematik der Vogelcestoden. *Abh. Kaiserl. Leop.-Carol. Deutschen Akad. Naturforscher, 79*, 265-450.

FUHRMANN O. (1932): Les Ténias des Oiseaux. *Mem. Univ. Neuchâtel, 8*, 385 p.

HWANG J. C., KATES K. C. (1956): Morphological variations in the Embrionic Hooks of Tapeworms. *Journ. Parasitol., 42, (n. 4 - sect. 2)*, 41.

JOYEUX CH., BAER J. G. (1954): Cestodes et Acantocéphales récoltés par Patrice Paulian aux Iles Kerguelen et Amsterdam, 1951-1952. *Mem. Inst. Sci. Madagascar, ser. A, 9*, 23-40.

KRABBE H. (1869): Bidrag til Kundskab om Fuglenes Baendelorme. *Dansk. Vidensk. Selsk. Skr., Naturvid. Math., 8*, 249-363.

LINTON E. (1927): Notes on Cestode Parasites of Birds. *Proc. U. S. Nat. Mus., 70*, 1-73.

LOPEZ-NEYRA C. R. (1943): Reflexiones sobre la importancia de la evolucion uterina en la sistematica de los Ciclofilididos. *Rev. Iberica Parasit., III*, 30-54.

LOPEZ-NEYRA C. R. (1944): Compendio de Helmintologia Iberica (Continuaciòn). *Rev. Iberica Parasit., IV*, 403-466.

LOPEZ-NEYRA C. R. (1947): Consideraciones sobre la sistematica actual de los Ciclofilididos. *Mem. Real. Acad. Cienc. Exactas, Fis. y Nat. - Ser. Cienc. Nat.*, 9, 106 p.

LOPEZ-NEYRA C. R. (1951): Analisis critico de los géneros *Choanotaenia*, *Anomotaenia* y afines, con redescripcion de la *Taenia porosa* Rudolphi, 1810, e invalidez del género *Paricterotaenia* Fuhrmann, 1932. (Primera parte). *Rev. Iberica Parasit.*, 11, 337-368.

LOPEZ-NEYRA C. R. (1952): Analisis critico de los géneros *Choanotaenia*, *Anomotaenia* y afines, con redescripcion de la *Taenia porosa* Rudolphi, 1810 e invalidez del género *Paricterotaenia* Fuhrmann, 1932. (Segunda parte y final). *Rev. Iberica Parasit.*, 12, 1-58.

OGREN R. E. (1955): Development and Morphology of Glandular Regions in Oncospheres of *Hymenolepis nana*. *Proc. Pensylvania Acad. Sci.*, 29, 258-264.

OGREN R. E. (1956): Development and Morphology of the Oncosphere of *Mesocestoides Corti*, a Tapeworm of Mammals. *Journ. Parasit.*, 42, 414-428.

REID W. H. (1948): Penetration glands in Cyclophyllidean onchosperes. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 67, 177.

ST. REMY G. (1900): Contribution à l'étude du développement des Cestodes. I. Le développement embryonnaire dans le genre *Anoplocephala*. *Arch. Parasit.*, 3, 292-315.

ST. REMY G. (1901): Contribution à l'étude du développement des Cestodes. II. Le développement de *Taenia serrata* Goeze. *Arch. Parasitol.*, 4, 143-156.

SILVERMAN P. H. (1954): Studies on the biology of some Tapeworms of the genus *Taenia*. II) The morphology and development of the Taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, 48, 356-366.

SILVERMAN P. H., MANEELY R. B. (1955): Studies on the biology of some Tapeworms of the genus *Taenia*. III) The rôle of the secreting gland of the hexacanth embryo in the penetration of the intestinal mucosa of the intermediate host, and some of its histochemical reactions. *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, 49, 326-330.

SMYTH J. D. (1951): Egg-shell formation in Trematodes and Cestodes as demonstrated by the methyl or malachite green techniques. *Nature*, 168, 322.

SMYTH J. D. (1956): Studies on Tapeworm Physiology. IX. A Histochemical Study of Egg-Shell Formation in *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea). *Exp. Parasitology*, V, 519-540.

SPAETLICH W. (1926): Die Furchung und Embryonalhuellenbildung des Eies von *Diorchis inflata* Rud.. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. u. Ontogenie d. Tiere*, 47, 101-113.

van BENEDEN E. (1881): Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Ténias. *Arch. Biol.*, 2, 183-210.

von JANICKI C. (1907): Ueber die Embryonalentwicklung von *Taenia serrata* Goeze. *Zeitschr. f. Wiss. Zool.*, 87, 686-724.

YOUNG R. T. (1950): Cestodes of California Gulls. *Journ. Parasit.*, 36, 9-12.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVIII - N. 3 - Luglio 1957

ENHANCED SUSCEPTIBILITY OF A DDT-RESISTANT STRAIN OF HOUSEFLIES TOWARDS ALKYL AND ARYL BROMOACETATES (*)

K. R. SIMON ASCHER (**)

INTRODUCTION:

In a previous study (ASCHER and KOCHER 1954) it was found, that a highly resistant Swiss strain of *Musca domestica* L. (K_1-strain) showed a quicker **k. d.** by stomach poisoning with solutions of alkali bromides, than a non-resistant strain (T_1). In a search for contact insecticides containing organically bound bromine, which could be liberated in the form of bromide ion within the resistant fly after tarsal contact, our attention was drawn to a series of papers by BETTINI and BOCCACCI (BETTINI and BOCCACCI 1952, 1955, 1955a, 1956; BETTINI et al. 1955, 1956) who have carried out a thorough investigation into the mode of action of chloro-, bromo- and iodoacetic acids in *Musca domestica* and *Periplaneta americana*. These acids appear to act in vertebrates as well as in invertebrates by alkylating and, therefore, inhibiting thiol enzymes; in invertebrates, the inhibition of TPD (triosephosphate dehydrogenase) seems to play a major rôle in this respect.

Regarding derivatives of the haloacetic acids, the Italian group directed its main effort towards esters of chloroacetic acid (BETTINI and BOCCACCI 1952, and BOCCACCI and BETTINI 1956). Since it has been postulated (BETTINI et al. 1955) that in invertebrates the following interaction between bromoacetic acid and thiol enzymes is taking place:



$$R.SH + BrCH_2.COOH = R.SCH_2.COOH + HBr$$

it seemed worthwhile to test bromoacetic acid and its esters against resistant

(*) A contribution from the *Medical Research Laboratories, Medical Corps, Israel Defence Forces.*

(**) Present address: *Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.*

houseflies, as these compounds would not only inhibit thiol enzymes, but also release bromide ions. On basis of our previous work (ASCHER and KOCHER 1954) we hoped that through release of the bromide ion at an adequate site of action, a faster k. d. could be brought about in DDT-resistant flies than in normal flies.

It was soon evident, however, that bromoacetic acid itself could not be used as residual contact agent due to its high volatility. Some of its esters were prepared, therefore, in order a) to reduce volatility and b) to improve penetration by the introduction of liposolvent groups. The presence of aliphatic as well as aromatic esterases in the tissues of the housefly (METCALF et al. 1955, 1956) led us to assume that the esters would be hydrolyzed within the fly, yielding bromoacetic acid.

EXPERIMENTAL.

CHEMICALS.

1) The following α-halogenated acids were tested:
   - Chloroacetic acid
   - Bromoacetic acid
   - α-Bromopropionic acid
   - Iodoacetic acid

2) The majority of the following bromoacetates were prepared by Dr. NEEMAN and his staff at the Laboratories of the Research Council of Israel:

Bromoacetate	*b. p.*	*Remarks*
n-propyl	69-70°/13 mm	These compounds are strongly lachrymatory and were not tested.
n-butyl	87-88°/17 mm	
iso-butyl	85°/14 mm	
n-hexyl	117°/13 mm	
n-decyl	98-100°/0.03 mm	
n-dodecyl (lauryl)	172-174°/6 mm	
myristyl	137°/1 mm	
cetyl	206°/2 mm; 184-186°/0.4 mm	
stearyl	m.p. 35°	
phenyl	105°/3 mm; m.p. 27°	
benzyl	150-151°/2 mm	
p-chlorophenyl	138-140°/3 mm	
p-bromophenyl	110-111°/1 mm	
β-buthoxyethyl	132°/2 mm	

For comparison the following *chloroacetates* were tested:

lauryl *	
myristyl *	
cetyl	b.p. 165°/1 mm; m.p. 23°

(*) I am indebted to M. BOCCACCI for kindly preparing lauryl and myristyl chloroacetate for this study.

Biological Material.

Two Israeli strains of *Musca vicina* Macq. were used for the majority of the experiments:

1) A susceptible strain (T-strain)

2) A highly DDT-resistant strain (R-strain, see Reuter and Ascher 1956).

Some experiments were carried out on two Swiss strains of *Musca domestica* L. (obtained through courtesy of Dr. C. Kocher, J. R. Geigy, S. A., Basle):

3) A susceptible strain (T_1 -strain)

4) A highly polyvalent-resistant strain, obtained through selection with DDT (K_1-strain, see Ascher and Kocher, 1954).

All flies used were ♀, 2-4 days old, fed water and sugar only. Great care was taken to use pupae of equal weights, when flies of strains T and R, and T_1 and K_1 respectively were compared. Each experiment was done with 40 flies and repeated several times.

Testing Methods.

a) *Tarsal contact of long duration.*

All experiments were carried out in Petri dishes; the treated surface was always the greater inverted half of the dish, which was closed with the smaller half placed in top. The latter was dusted lightly with talc, which effectively prevented flies from alighting on it and compelled them to remain on the treated surface. Contact time was 2 hours, observations being taken at 10, 20, 30, 60, 90, and 120 minutes (see Kocher et al. 1953).

For the haloacetic acids and α-bromopropionic acid a disk of filter paper was placed in the lower Petri dish and the compounds were applied to it dissolved in a mixture of 1 part of olive oil and 2 parts of acetone; (the acids evaporated when applied in a solution in acetone only). The age of the deposits was 1 hour.

The esters of bromoacetic acid were applied in acetone solutions on glass (Petri dishes) and tested after 24 hours, 7 days, 14 days etc. (except hexyl bromoacetate, which is very volatile).

Results were summed up in the form of Σ%k. d. (for a detailed explanation of this value see Kocher et al. 1954; for examples of its application, Kocher et al. 1953, Reuter and Ascher 1956).

b) *Gaseous-phase action*

Gaseous-phase action was determined with help of the method previously described (Reuter and Ascher, 1956).

Results

A) *The acids.*

Contact of long duration of the acids with strains T and R is recorded in Table 1. Since the haloacetic acids produced in flies a somewhat uncommon form of paralysis (stretched extremities) with death occuring without the conventional type of k. d. encountered in the case of chlorinated hydrocarbons (k. d. on back), it was somewhat difficult to read the results. No such difficulty was encountered with the esters of bromoacetic acid, in which the usual type of k. d. was observed.

TABLE 1

Continuous contact of the acids with strains T and R.

Deposits 1 hour old, on filter paper, from acetone-olive oil mixtures; T° = 25°*C.*

g/sq. m.	10.0		8.0		6.0		4.0		2.0	
Observation time	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R
	Chloroacetic acid, % k. d.									
10′	—	—		—	—	—	—	—	no k. d. within 2 h.	
20′	—	—	—	—	—	–	—	—		
30′	—	—	—	—	—		—	—		
60′	30	25	15	5	10	5	—	—		
90′	30	55	30	40	20	25	—	—		
120′	75	90	45	60	40	50	5	10		
Σ % k. d.	135	170	90	105	70	80	5	10	0	0
	Bromoacetic acid, % k. d.									
10′	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20′	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—
30′	10	25	20	30	—	—	—	—	—	—
60′	50	90	25	50	25	20	5	15	—	—
90′	100	100	90	100	50	80	25	25		—
120′	100	100	100	100	80	100	40	50	5	30
Σ % k. d.	260	315	235	285	155	200	70	90	5	30
	α-Bromopropionic acid, % k. d.									
10′	—	—	—	—	—	—	no k. d. within 2 h.		no k. d. within 2 h.	
20′	—	—	—	—	—	—				
30′	—	—	—	—	—	—				
60′	–	15	—	5	—	—				
90′	10	25	10	10	10	—				
120′	30	55	15	50	10	30				
Σ % k. d.	40	95	25	65	20	30	0	0	0	0
	Iodoacetic acid, % k. d.									
10′	—	—	—	—	—	—	no k. d. within 2 h.		no k. d. within 2 h.	
20′	—	—	—	—	—	—				
30′	—	20	—	—	—	—				
60′	40	25	25	25	—	30				
90′	100	100	80	80	50	35				
120′	100	100	100	100	60	35				
Σ % k. d.	240	245	205	205	110	100	0	0	0	0

no. k. d. in controls
(filter paper treated with oil-acetone)

It is evident that the order of activity is: bromoacetic acid ≧ iodoacetic acid > chloroacetic acid > α-bromopropionic acid. There can be noticed the tendency of bromoacetic acid and α-bromopropionic acid to cause a better k. d. in R-flies than in T-flies. No such tendency was found, when these experiments were repeated with a gamma-BHC resistant strain of *Musca vicina* Macq. (obtained through courtesy of Dr. A. S. TAHORI).

In order to demonstrate, that the differences in response to bromoacetic acid between the T- and R-strain are consistent at different temperatures, the lowest concentration of bromoacetic acid (2 g/sq. m.) was retested at three temperatures. These experiments (Table 2) also established a strongly positive temperature coefficient of the contact action of bromoacetic acid. Iodoacetic acid, on the other hand, did not show any difference in the response of the T- and R-strain, when tested at the highest temperature (31°C).

TABLE 2

Continuous contact of bromoacetic acid at 25°, 28°, 31°C
and of iodoacetic acid at 31°C, with strains T and R.
2 *g/sq. m., deposits 1 hour old, on filter paper, from acetone-olive oil mixtures.*

	Bromoacetic acid, % k d.						Iodoacetic acid	
T° =	25°		28°		31°		31°	
Obs. time	T	R	T	R	T	R	T	R
10′	—	—	—	—	—	—	—	—
20′	—	—	—	—	—	—	—	—
30′	—	—	—	—	—	—	—	—
60′	—	—	—	20	7	52	10	10
90′	—	5	13	30	27	60	7	10
120′	5	25	27	52	37	62	17	13
Σ % k. d.	5	30	40	102	71	174	34	33

no k. d. in controls

These differences in the response of the flies to bromoacetic acid at different temperatures cannot be ascribed to increase in gaseous-phase action with temperature, since a) the gaseous-phase action in these experiments is strongly reduced due to the residue being absorbed on filter paper and dissolved in olive oil and b) even a 10 g/sq.m. residue of the acids shows at most a faint gaseous vapour action within 2 hours and moreover, the gaseous vapour action is pronouncedly stronger towards T-flies than towards R-flies. (Table 3).

TABLE 3

Gaseous vapour action of the acids at 28°C.
10 *g/sq.m., deposits 1 h. old, on filter paper, from acetone-olive oil mixtures.*

Obs. time	% k. d.					
	Chloroacetic acid		Bromoacetic acid		Iodoacetic acid	
	T	R	T	R	T	R
1 h.	—	—	—	—	—	—
2 h.	—	—	40	—	25	—
3 h.	25	5	95	15	25	—
4 h.	100	25	100	50	85	—
5 h.	100	65	100	70	100	—

no. k. d. in controls

B) *Hexyl bromoacetate.*

Also this compound is very volatile. It was, however, tested, as the other esters of bromoacetic acid, as residue on glass from acetone solutions. The residue had to be tested within 1 hour, since the substance shortly later on evaporated completely; it was compared under these conditions with bromoacetic acid (Table 4).

TABLE 4

Continuous contact of hexyl bromoacetate
and bromoacetic acid with strains T and R.
1 *g/sq.m., deposits 1 hour old, on glass, from acetone solutions; T° = 28°C.*

Obs. time	% k. d.			
	Hexylbromoacetate		Bromoacetic acid	
	T	R	T	R
10′	35	80	—	10
20′	90	100	65	100
30′	100	100	65	100
60′	100	100	100	100
90′	100	100	100	100
120′	100	100	100	100
Σ % k. d.	525	580	430	510

no k. d. in controls

TABLE 5

Continuous contact of esters of bromoacetic acid with strains T and R.
Deposits on glass from acetone solution; T° = 28° C.

Age of deposit / Observation time	1 day T	1 day R	7 days T	7 days R	14 days T	14 days R	21 days T	21 days R
	a) Decyl bromoacetate 1 g/sq. m., % k. d.							
10′	7	—	—	—	no k. d. within 2 hours			
20′	15	5	—	—				
30′	42	57	—	5				
60′	81	95	5	10				
90′	100	100	22	22				
120′	100	100	22	22				
Σ % k. d.	345	357	49	59	0	0		
	b) Lauryl bromoacetate 1 g/sq. m., % k. d.							
10′	7	15	—	—	no. k. d. within 2 hours			
20′	50	50	—	—				
30′	77	65	—	—				
60′	82	90	12	15				
90′	87	100	27	27				
120′	100	100	30	50				
Σ % k. d.	403	420	69	92	0	0		
	b′) Lauryl bromoacetate 0.5 g/sq. m., % k. d.							
10′	—	—	no k. d. within 2 hours		no k. d. within 2 hours			
20′	12	22		—				
30′	30	55		—				
60′	60	80		—				
90′	70	87		—				
120′	85	97		17				
Σ % k. d.	257	341	0	17	0	0		
	b″) Lauryl bromoacetate 0.2 g/sq. m., % k. d.							
10′	—	—	no k. d. within 2 hours					
20′	5	—						
30′	5	5						
60′	5	12						
90′	10	30						
120′	32	47						
Σ % k. d.	57	94	0	0				
	c) Myristyl bromoacetate 1 g/sq. m., % k. d.							
10′	—	5	5	—	—	—	no k. d. within 2 hours	—
20′	5	17	5	2	—	—		—
30′	22	37	20	17	—	—		—
60′	70	75	35	42	10	—		—
90′	95	95	60	72	22	20		10
120′	100	100	75	87	30	30		25
Σ % k. d.	292	329	200	220	62	50	0	35

no k. d. in controls

TABLE 5 (*continued*)

Age of deposit	1 day		7 days		14 days		21 days	
Observation time	T	R	T	R	T	R	T	R
	d) Cetyl bromoacetate 1 g/sq. m., % k. d.							
10′	—	—	—	—	—	—	—	—
20′	—	—	—	—	—	—	—	—
30′	—	5	—	—	—	—	—	—
60′	7	25	10	17	10	17	—	—
90′	60	70	35	55	22	32	—	7
120′	75	92	70	75	50	60	7	25
Σ % k. d.	142	192	115	147	82	109	7	32
	e) Stearyl bromoacetate, 1 g/sq. m., % k. d.							
	no. k. d. within 2 hours							
Age of deposit	1 day		7 days		1 day		7 days	
	f) Benzyl bromoacetate 1 g/sq. m.				Phenyl bromoacetate 1 g/sq. m.			
10′	—	5	no k. d. within 2 hours		5	—	no k. d. within 2 hours	
20′	2	45			17	27		
30′	15	62			22	27		
60′	37	80			30	49		
90′	55	80			30	55		
120′	97	100			37	77		
Σ % k. d.	206	372	0	0	141	235	0	0
	h) p-Chlorophenyl bromoacetate 1 g/sq. m.				i) p-Bromophenyl bromoacetate 1 g/sq. m.			
10′	—	—	no k. d. within 2 hours		10	5	no k. d. within 2 hours	
20′	5	32			22	15		
30′	27	85			47	50		
60′	62	95			90	90		
90′	75	100			100	100		
120	82	100			100	100		
Σ % k. d.	251	412	0	0	369	360	0	0
	k) β-Buthoxyethyl bromoacetate 1 g/sq. m.							
	1 day		7 days		14 days			
10′	—	—	—	—	no k. d. within 2 hours			
20′	—	—	—	—				
30′	30	35	2	—				
60′	70	95	7	–				
90′	95	100	10	2				
120′	100	100	12	20				
Σ % k. d.	295	330	31	22	0	0		

no k. d. in controls

C) *Higher esters of bromoacetic acid.*

Since hexyl bromoacetate was evidently too volatile, higher esters of bromoacetic acid, which showed a much better activity and residual action, were tested. (Table 5 & 5a). For some of them the better k. d. properties towards strain R can be seen, while in some others the differences were too small to be significant, or were absent. The differences seem to be well established for the lower concentrations of lauryl bromoacetate and for cetyl, benzyl, phenyl and *p*-chlorophenyl bromoacetate.

Since the best residual properties were exhibited in this series by lauryl, myristyl and cetyl bromoacetates, the corresponding *chloroacetates* were tested according to the same method. But 24 hours old residues of lauryl, myristyl and cetyl chloroacetate gave no k. d. at all within 2 hours of exposure. This clearly indicates, that the respective bromoacetates are superior to these chloroacetates as regards k. d. on continuous exposure.

Flies exposed to the esters of bromoacetic acid fall on their back with extremities extended. In most cases a drop of clear regurgitated fluid appears at the proboscis of the flies in k. d.

It was also deemed of interest to investigate the gaseous-phase action of the most active esters. Results are summarized in Table 6.

TABLE 6

Gaseous vapour action of some esters of bromoacetic acid at 28°C towards R-flies.
1 *g/sq.m., deposits 1 day old, on glass, from acetone solutions.*

Obs. time, hours	% k. d., bromoacetates						
	Lauryl	Myristyl	Cetyl	Phenyl	Benzyl	p - Chlorophenyl	p - Bromophenyl
0.5	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	22	2
1.5	—	—	—	—	—	22	5
2	—	—	—	—	7	90	5
2.5	—	—	—	—	25	90	5
3	—	—	—	—	42	95	25
4	—	—	—	2	87	100	100
5	2	—	—	12	95	100	100
6	12	—	-	17	100	100	100

no k. d. in controls

The compounds with the highest gaseous action are thus *p*-chlorophenyl > *p*-bromophenyl > benzyl bromoacetate, while lauryl, myristyl and cetyl bromoacetate have practically no gaseous action at all.

It was, however, deemed necessary to test some of these compounds also against other resistant and normal strains of the housefly. An extremely DDT- and polyvalent - resistant Swiss strain of *Musca domestica* L. (K_1) and a normal Swiss strain (T_1) were compared for this purpose. Since however the level of results with these strains is very similar to that of the R and T strain (Table 5), results are given only in terms of Σ % k. d. (Table 7).

TABLE 7

Continuous contact of esters of bromoacetic acid, with strains T_1 and K_1.

Deposits on glass from acetone solutions; 1 *g/sq.m.; T°* = 28°*C.*

Results expressed as Σ % *k.d. from observations after* 10, 20, 30, 60, 90, 120 *minutes contact.*

Σ % k. d.				
Age of deposit	1 day		7 days	
	T_1	K_1	T_1	K_1
Decyl bromoacetate	406	399	0	0
Lauryl »	347	254	37	42
Myristyl »	306	213	171	196
Cetyl »	194	234	89	122
Stearyl »	0	0	—	—
p-Chlorophenyl bromoacetate . .	395	267	0	0
p-Bromophenyl » . .	417	310	0	0
β-Buthoxyethyl » . .	311	294	0	0

no k. d. in controls

However, in this case the esters of bromoacetic acid caused a *slower* k. d. in the resistant strain (K_1), (except cetyl bromoacetate, which consistently gave somewhat better results against the K_1-strain than against the T_1-strain). Since in extremely resistant housefly strains, resistance depends to a large extent on blockage of penetration to the site of action due to enhanced fat content in the tarsi and elsewhere (WIESMANN & REIFF 1956), it stands to reason, that this factor predominates in the K_1-strain and overshadows any *preferential* toxicity due to liberation of bromide ion.

Some experiments on strains K_1 and T_1 were also carried out with the

alkyl bromoacetates at various temperatures, but again k. d. was slower in K_1 than in T_1, or there was no difference — except again in the case of cetyl bromoacetate (Table 8). Whether the nature of the fat barrier in K_1 is such as to allow access specifically to the cetyl ester, is a mere conjecture.

TABLE 8

Continuous contact of alkyl bromoacetates, with strains T_1 and K_1, at different temperatures.
1 g/sq.m., deposits 1 day old, from acetone solutions, on glass. Results expressed in Σ % k.d.

	Σ % k. d.					
T° =	25° C		28° C		31° C	
	T_1	K_1	T_1	K_1	T_1	K_1
Decyl bromoacetate . . .	349	366	406	309	not done	
Lauryl » . . .	359	246	347	254	401	312
Myristyl » . . .	242	169	306	213	288	289
Cetyl. » . . .	90	134	194	234	234	278
Stearyl » . . .	0	0	0	0	0	0

no k. d. in controls

DISCUSSION: It is of interest to note, that some esters of bromoacetic acid are residual contact insecticides. All of those, namely decyl, lauryl, myristyl and cetyl bromoacetate had molecular weights lying approximately between 285 and 365, which agrees well with the molecular weight of other residual contact insecticides among the chlorinated hydrocarbons. Other active compounds, such as phenyl, *p*-chlorophenyl and *p*-bromophenyl bromoacetate have an intense but short-lived fumigant action.

It has to be admitted, however, that the residual contact action of the four alkyl bromoacetates is much too weak and of too short a duration to be of any practical value. Another drawback of the bromoacetates (and indeed of all the three haloacetic acids tested, and their esters) is the comparatively slow onset of k. d.

A point in favour of the haloacetates is the fact, that the development of resistance towards chloroacetic acid is exceedingly slow, as demonstrated by BETTINI and BOCCACCI 1955, BOCCACCI and BETTINI 1956. According to the latter publication, there was no appreciable rise of resistance to chloroacetic acid in the housefly after 53 generations of selection. A further search for more potent bromoacetates may be indicated, therefore.

In this laboratory, hundreds of different compounds have been screened

with the aid of strains T and R of *Musca vicina*. The compounds screened were comprised of chlorinated hydrocarbons, organic phosphorus compounds, substituted sulphonamides, substituted fluoroacetamides etc. In all cases of toxic compounds, a better response was obtained with the T (susceptible) strain. Only with bromoacetic acid and some of its esters did we note the contrary effect, viz. better action on the R-strain. Unfortunately these findings did not apply to the K_1 and T_1 strains of *Musca domestica*.

The definitely better k. d. properties of bromoacetates as compared to chloroacetates are probably due to the release of bromide ion (see reaction scheme on page 185), which has been shown by ASCHER and KOCHER (1954) to be markedly toxic to houseflies on ingestion, while chloride and iodide were non-toxic.

ACKNOWLEDGEMENT. — Thanks are due to Miss D. ROCH and Mr. A. BEN-SHMUEL for technical help.

SUMMARY

1) On basis of a previous work (ASCHER and KOCHER, 1954) and a series of papers by BETTINI, BOCCACCI and coworkers, chloro-, bromo-, iodoacetic acids and some esters of bromoacetic acid were tested as to their contact-toxicity against a DDT-resistant and a normal strain of *Musca vicina* Macq. (R and T) and a polyvalent-resistant and a normal strain of *Musca domestica* L. (K_1 and T_1).

2) The contact activity of the acids for strains R and T was found to decrease in the order bromo-, iodo- and chloroacetic acid, R showing a quicker k.d. than T on exposure to bromoacetic acid. The same tendency was noted in experiments with α-bromopropionic acid. Bromoacetic acid was also tested at various temperatures and the vapour-phase action of the three haloacetic acids was investigated. The order of acitivity was the same, but the T-strain responded better than R under these conditions.

3) Decyl, dodecyl, myristyl and cetyl bromoacetate had a certain residual contact action, the best initial k. d. being exhibited by lauryl, the longest residual action by cetyl bromoacetate. Stearyl bromoacetate was inactive. Of aromatic esters, the *p*-bromophenyl, *p*-chlorophenyl, benzyl and phenyl compound, in descending order of activity, were shown to possess a very short lived contact activity. Lauryl, cetyl, benzyl, phenyl and *p*-chlorophenyl bromoacetate had better k.d. properties towards the R-strain than towards the T-strain. As regards vapour-phase activity, the order was: *p*-chlorophenyl > *p*-bromophenyl > benzyl >> phenyl, while lauryl, myristyl, and cetyl bromoacetate had practically no vapour-phase action.

4) When the two strains K_1 and T_1 were tested against these esters the level of k.d. achieved on tarsal contact was about the same as towards R and T, but in all cases (except cetyl bromoacetate) the k.d. was quicker in the T_1 (susceptible) strain. This may be attributed to the « fat-barrier » existing in the K_1-strain (WIESMANN and REIFF, 1956).

RIASSUNTO

1) In base ad un precedente lavoro (ASCHER e KOCHER, 1954) e ad una serie di scritti di BETTINI, BOCCACCI e collaboratori, è stata saggiata la tossicità per contatto verso un ceppo DDT-resistente ed uno normale di *Musca vicina* Macq. (R e T) ed un ceppo a resistenza polivalente ed uno normale di *Musca domestica* L. (K_1 e T_1) degli acidi cloro-, bromo- e iodoacetico ed alcuni esteri dell'acido bromoacetico.

2) E' stato rilevato che l'attività per contatto degli acidi per i ceppi R e T decresce nell'ordine dal bromo- allo iodo- al cloroacetico, R presentando inoltre una più rapida k.d. di T all'esposizione all'acido bromoacetico. Analoga tendenza è stata osservata in esperimenti con l'acido α-bromopropionico. L'acido bromoacetico è stato anche saggiato a varie temperature, ed è stata indagata l'azione allo stato di vapore dei tre acidi aloacetici. L'ordine dell'attività è stato lo stesso, ma in queste condizioni il ceppo T ha risposto meglio di R.

3) Decil, dodecil, miristil e cetil bromoacetato hanno avuto una certa azione residua per contatto; la migliore k.d. iniziale è stata presentata dal lauril, la più prolungata azione residua dal cetil bromoacetato. Lo stearil bromoacetato è stato inattivo. Degli esteri aromatici i composti di *p*-bromofenil, *p*-clorofenil, benzil e fenil, in ordine discendente di attività, hanno mostrato di possedere una cortissima attività per contatto. Lauril, cetil, benzil, fenil e *p*-clorofenil bromoacetato hanno migliori proprietà k.d. nei confronti del ceppo R che del ceppo T. Riguardo all'attività allo stato di vapore, l'ordine è stato: *p*-clorofenil, *p*-bromofenil, benzil, fenil, mentre lauril, miristil e cetil bromoacetato non hanno praticamente avuto azione allo stato di vapore.

4) Quando i due ceppi K_1 e T_1 furono saggiati nei confronti di questi esteri, il grado di k.d. raggiunto con il contatto tarsale fu presso a poco lo stesso che con R e T, ma in tutti i casi (eccetto con il cetil bromoacetato) la k.d. fu più rapida nel ceppo T_1 (sensibile). Ciò può essere attribuito alla «barriera di grasso» esistente nel ceppo K_1 (WIESMANN e REIFF, 1956).

BIBLIOGRAPHY

ASCHER K. R. S. and KOCHER C. (1954): *Experientia, 10*, 465.
BETTINI S. and BOCCACCI M. (1952): *Riv. Parassit., 13*, 165.
BETTINI S. and BOCCACCI M. (1955): *Riv. Parassit., 16*, 13.
BETTINI S. and BOCCACCI M. (1955a): *Experientia, 11*, 70.
BETTINI S. and BOCCACCI M. (1956): *J. Econ. Ent., 49*, 554.
BETTINI S., BOCCACCI M. and ROSSI C. (1955): *Riv. Parassit., 16*, 103.
BETTINI S., NATALIZI G. and BOCCACCI M. (1956): *Riv. Parassit., 17*, 179.
BOCCACCI M. and BETTINI S. (1956): *Rend. Ist. Sup. Sanità. 19*, 1257.
KOCHER C., ROTH W. and TREBOUX J. (1953): *Anz. Schädlingsk., 26*, 65.
KOCHER C., ASCHER K. R. S., ROTH W. and TREBOUX J. (1954): « Information of the Pest Control Department », J. R. Geigy S. A., 14. 10. 1954.
METCALF R. L., MARCH R. B. and MAXON M. G. (1955): *Ann. Ent. Soc. Am., 48*, 222.
METCALF R. L., MAXON M. G., FUKUTO T. R. and MARCH R. B. (1956): *Ann. Ent. Soc. Am., 49*, 274.
REUTER S. and ASCHER K. R. S. (1956): *Experientia, 12*, 316.
WIESMANN R. and REIFF M. (1956): *Verh. Naturf. Ges. Basel, 67*, 311.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVIII - N. 3 - Luglio 1957

NOTE E OSSERVAZIONI

RICERCHE GENETICHE SULLA RESISTENZA AL DDT IN *MUSCA DOMESTICA* CONCATENAZIONE DEL GENE *kdr* (*knockdown - resistance*) CON DUE MUTANTI MORFOLOGIGI.

Ricerche su *Musca domestica* L. tuttora in corso hanno consentito di riconoscere la esistenza di concatenazione tra due geni recessivi (*bwb* = *brown body*, corpo giallo-bruno, trovato da HARRISON C. M.; *dv* = *divergent*, ali divergenti, trovato da MILANI, 1954a) e il gene incompletamente recessivo *kdr* (= *knockdown resistance*, resistenza al DDT; riconosciuto e descritto da MILANI, 1954b).

Le combinazioni binarie *bwb* e *dv*, *bwb* e *kdr* sono state saggiate in appaiamento e in opposizione, mentre la combinazione ternaria *bwb*, *dv*, *kdr* è stata esaminata soltanto in appaiamento; in tutti i casi il mutante *kdr* è stato incrociato con due ceppi sensibili distinti.

I saggi tossicologici sono stati eseguiti usando una dose discriminante, somministrata con contatto tarsale su carta da filtro impregnata di soluzione oleosa di DDT commerciale (0,40mgr/cm2), seguendo il metodo già descritto da uno di noi (M. R.: 1954b); sono stati classificati *sensibili* (*kdr*+) gli individui caduti in supinazione entro le prime due ore di contatto; dopo tale periodo normalmente la caduta si interrompe e subentra una pausa di alcune ore prima che inizi la comparsa di sintomi di intossicazione tra gli individui resistenti (*kdr*).

Una parte dei risultati ottenuti è esposta nelle tabelle. Da queste si può rilevare che in quasi tutti gli esperimenti i mutanti *bwb* e *kdr* hanno avuto frequenze che si accordano con i rapporti attesi per i caratteri monofattoriali; invece il carattere *dv* è ricomparso con frequenze troppo basse; è sperimentalmente accertato, benchè non documentato in questa sede, che questo dipende da incompleta penetranza, rilevabile anche dai protocolli di allevamento dei ceppi contenenti *dv;* per questo fatto sono stati usati metodi particolari negli esami delle frequenze di ricombinazione.

Risulta assai chiaramente dalle tabelle che il reincrocio di un individuo eterozigote per tutti i caratteri considerati con un individuo omozigote per gli stessi dà risultati profondamente diversi a seconda del sesso dell'individuo eterozigote: quando questo è un maschio la quasi totalità dei suoi figli ripete le combinazioni con cui i caratteri erano stati introdotti nell'incrocio originario (generazione P); quando invece l'individuo eterozigote è una femmina la frequenza delle combinazioni nuove è molto elevata. Gli incroci di due individui eterozigoti hanno dato frequenze di ricombinazione in accordo con quelle date dai reincroci di femmine eterozigoti quando i mutanti erano stati introdotti in appaiamento, e frequenze in accordo con i reincroci di maschi eterozigoti quando i mutanti erano stati introdotti in repulsione.

TABELLA 1

Ricombinazione dei mutanti bwb *e* dv.

Serie sperimentale o (gruppo di serie)	Tipo di incrocio	Incroci di individui F_1	F_2: Ricombinazioni					Segregazioni monofattoriali	
			a +	b *bwb*	c *dv*	d *bwb, dv*	a+b+c+d *tot.*	b + d *bwb*	c + d *dv*
A) (gruppo di serie)	*bwb* × *dv*. in repulsione	♀ F_1 × ♂ F_1	4041	1570	1159	51	6821	1621	1210
B)	*bwb, dv* × +, + in associazione	♀ F_1 × ♂ F_1	1650	287	230	208	2375	495	435
C)	*bwb, dv* × +, + in associazione	♀ F_1 × ♂ *bwb, dv*	456	325	312	432	1525	757	744
D)	*bwb, dv* × +, + in associazione	♀ *bwb, dv* × ♂ F_1	404	2	1	326	733	328	327

Serie sperimentale o (gruppo di serie)	Testi delle segregazioni dei singoli caratteri (chi^2, 1 grado di libertà)		% di interscambio tra i marcatori
	bwb	*dv*	*bwb* e *dv*
A)	5,55	191,77	0,06
B)	21,90	45,47	48,69
C	0,08	0,87	41,77
D)	8,51	8,09	0,41

TABELLA 2

Segregazioni e ricombinazioni dei mutanti bwb, dv, kdr.

Serie sperim.	Incrocio parentale	Incroci di individui F_1	F_2 Combinazioni parentali		F_2 Ricombinazioni						
			+	*bwb, dv, kdr*	*kdr*	*bwb, dv*	*dv*	*bwb, kdr*	*bwb*	*dv, kdr*	*tot.*
E)	♀ *bwb, dv, kdr* ♂ *ocra, vti*	♀ *bwb, dv, kdr* ♂ F_1	460	362	1	4	9	45	5	0	886
F)	♀ *Terminillo* ♂ *bwb, dv, vti*	♀ *bwb, dv, kdr,* ♂ F_1	251	170	1	1	0	51	0	0	474
G)	♀ *bwb, dv, kdr* ♂ *ocra, vti*	♀ F_1 ♂ *bwb, dv, kdr*	152	82	111	82	46	80	98	45	696
H)	♀ *Terminillo* ♂ *bwb, dv, kdr*	♀ F_1 ♂ *bwb, dv, kdr*	97	76	83	61	44	70	74	58	563
I)	♀ *bwb, dv, kdr,* ♂ *ocra, vti*	♀ F_1 ♂ F_1	134	6	19	7	12	12	17	8	215
L)	♀ *Terminillo* ♂ *bwb, dv, kdr*	♀ F_1 ♂ F_1	443	41	66	32	41	43	73	41	780

Serie sperim.	Testi delle segregazioni dei singoli caratteri (chi², 1 grado libertà)			% di interscambio fra i marcatori		
	bwb	*dv*	*kdr*	*bwb; dv*	*bwb; kdr*	*dv, kdr*
E)	3,29	20,76	5,53	2,40	1,12	3,46
F)	1,90	36,20	1,90	0,00	0,42	0,58
G)	0,21	49,70	5,17	38,64	48,28	45,83
H)	0,002	0,39	0,21	43,69	49,02	45,82
I)	3,42	10,68	1,89	45,58	47,44	46,50
L)	0,25	10,93	0,11	50,77	48,18	46,66

Questi fatti indicano che i tre caratteri appartengono allo stesso gruppo di concatenazione, ma sono tra loro molto distanti; le frequenze di ricombinazione osservate nei reincroci di femmine eterozigoti sono approssimativamente 40% nel tratto *bwb, dv;* 45% nel tratto *dv, kdr;* 50% nel tratto *bwb, kdr;* l'ordine più probabile sembra essere *bwb, dv, kdr;* tuttavia le distanze tra questi tre loci sono troppo grandi per consentire una interpretazione sicura.

In qualche serie sperimentale l'abbattimento degli individui sensibili si è protratto più a lungo nelle F_2 che nelle F_1.

La comparsa di una classe di ricombinazione nelle F_2 ottenute da incroci in cui i due mutanti erano stati introdotti in opposizione e la comparsa di classi di ricombinazione nei reincroci di maschi eterozigoti dimostrano che durante la gametogenesi maschile può avvenire interscambio; questo però ha frequenze assai basse e non costanti nelle diverse serie sperimentali; i controlli genetici effettuati sugli individui F_2 e qui non riportati indicano che i dati attuali possono in qualche caso essere errati per eccesso.

Una relazione completa su questi esperimenti è in corso di preparazione (Milani e Travaglino, 1957).

Riccardo Milani e Angela Travaglino
Istituto di Zoologia « L. Spallanzani », Pavia

BIBLIOGRAFIA

Milani R. (1954a): The genetics of the house fly. Preliminary note. Caryologia, vol. suppl. 1954: 791-796.

Milani R. (1954b): Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT e correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. *Riv. di Parass. XV*: 513-542. (anche in inglese: *Selected Sc. Papers, Ist. Sup. San. Rome*: I°: 176-212, 1956).

Milani R. e Travaglino A.: Symposia Genetica V°. (In stampa).

PREPARAZIONE DI UN SIERO IMMUNE ANTI-*LATRODECTUS* PER USO UMANO

In varie parti del mondo sono stati sperimentati su diversi animali ed impiegati infine sull'uomo, sieri anti-*Latrodectus* (siero di convalescenti, sieri immuni d'animali). La terapia specifica è stata usata in America del Nord e in America del Sud per l'intossicazione da veleno di *L. mactans* (Bogen; D'Amour, Becker e Van Ryer; Gray; Troise; Vellard); nel Sud Africa per l'avvelenamento da *L. indistinctus*, *L. concinnus* e *L. geometricus* (Finlayson (6, 7, 8, 9)); in Australia per *L. hasseltii* (Wiener); in Europa per l'avvelenamento da *L. tredecimguttatus* (Bettini e Calcara; Bettini, Ravaioli e Cantore; Maretic e Stanic; Stanic).

Attualmente sieri immuni per uso umano vengono prodotti in Argentina e negli S. U. d'America (*L. mactans*), nel Sud Africa (*L. indistinctus*), in Australia (*L. hasseltii*), in Jugoslavia ed in Italia (*L. tredecimguttatus*).

Già in precedenza avevamo ottenuto dal coniglio un siero immune specifico anti-*Latrodectus* (BETTINI, RAVAIOLI e CANTORE) ed in seguito, allo scopo di produrre una maggiore quantità di tale siero per usarlo in terapia umana, procedemmo alla immunizzazione di 3 pecore (*). Gli animali, di razza sopravissana e di sesso femminile, sono stati immunizzati seguendo una metodica diversa (v. tab. I, II, III). La prima pecora è stata inoculata sottocute con un omogenato in soluzione fisiologica di ghiandole velenifere secche di *L. tredecimguttatus*, la seconda con un omogenato di cefalotoraci in toto, e la terza con un omogenato di ghiandole fresche. Gli animali inoculati con tali sospensioni presentano una sintomatologia evidente: innanzi tutto l'inoculazione sottocute del materiale risulta molto dolorosa tanto che l'animale reagisce violentemente e zoppica per circa un'ora se inoculato ad un arto; si ha poi dopo pochi minuti defecazione e minzione, quindi uno stato ansioso, che si protrae per circa due ore, ed accompagnato da un aumento degli atti respiratori e delle pulsazioni.

Per la determinazione del titolo del siero si sono inoculate, con dosi scalari di siero immune, gruppi di cavie trattate contemporaneamente con 5 DL_{50} di ghiandole secche (la DL_{50} veniva determinata ad ogni nuova titolazione).

Dalle tabelle I, II e III appare evidente come sia possibile nel giro di alcuni mesi produrre dalla pecora un siero anti-*Latrodectus* ad alto titolo. Infatti la pecora n. 2 già dopo otto inoculazioni di cefalotoraci, (per un totale di 76), produceva un siero a titolo notevolmente alto, ed in seguito, con successive inoculazioni dello stesso antigene, (per un totale di 347 cefalotoraci), il siero dell'animale raggiungeva un titolo tale che 0,010 cm^3 erano sufficienti a proteggere da 5 DL_{50} di veleno (omogenato di ghiandole secche), cavie del peso di 250-300 g.

Un comportamento parallelo, per quanto riguarda l'aumento del potere immune del siero, si è notato nella pecora n. 1, inoculata con omogenato di sole ghiandole essiccate per un totale di 125 coppie, per cui erano sufficienti 0,017 cm^3 di siero per proteggere la cavia da 5 DL_{50}; tuttavia questa pecora moriva dopo la 9ª inoculazione di antigene in seguito a meteorismo intestinale acuto.

TABELLA 1.

*Produzione e titolazione del siero anti-*Latrodectus* per uso umano* (Pecora n. 1).

Antigene: Coppie di ghiandole essicate	Data di inoculazione	Data del salasso	Titolo del siero: necessari per proteggere una cavia del peso di 250-300 g da 5 DL_{50}
1	10.3.54		
2	10.4.54		
4	15.5.54		
8	12.6.54		
15	1.7.54		
15	20.7.54		
15	2.8.54		
20	25.8.54		
20	13.9.54		
25	1.10.54	15.10 54	0,017
Totale 125			
30	5.11.54		

La pecora è deceduta il 12-12-'54 per meteorismo intestinale acuto.

(*) Gli esemplari di *L. tredecimguttatus*, da cui è stato ricavato il materiale antigene, provengono dalla zona di Orbetello.

Tabella 2.

*Produzione e titolazione del siero anti-*Latrodectus *per uso umano* (Pecora n. 2).

Antigene: cefalotoraci	Data di inoculazione	Data del salasso	Titolo del siero: cm³ necessari per proteggere una cavia del peso di 250-300 g da $5DL_{50}$
2	4.3.54		
2	13.3.54		
4	22.3.54		
8	2.4.54		
15	3.7.54		
15	19·7.54		
15	13.10.54		
15	7.1.55		
Totale 76		24.1.55	0,15
18	17.3.55		
19	2.5.55		
30	28·6.55		
30	28.7.55		
Totale 173		8.10.55	0,017
30	14.10.55		
35	12.12.55		
35	7·2.56		
37	12.6.56		
37	3.7.56		
Totale 347		20.6.56	0,010
25	18.1.57		

La pecora partorisce due agnelli l'1-6-1956.

Tabella 3.

*Produzione e titolazione del siero anti-*Latrodectus *per uso umano* (Pecora n. 3).

Antigene: coppie di ghiandole fresche	Data di inoculazione	Data del salasso	Titolo del siero: cm³ necessari per proteggere una cavia del peso di 250-300 g da $5DL_{50}$
1	2.1.55		
2	17.3.55		
5	2.5.55		
8	28.6.55		
10	28.7.55		
Totale 26		8.10.55	0,50 non proteggono
15	15.10,55		
20	23.12.55		
25	31.1.56		
Totale 86		16.3.56	0,50 proteggono

La pecora è deceduta il 3-4-1956 per parto distocico.

Un differente quadro si è invece osservato nella pecora n. 3, inoculata con omogenato di ghiandole fresche; il siero di questo animale, anche dopo l'inoculazione complessiva di 86 coppie di ghiandole, ha mostrato un titolo praticamente basso, tanto che per proteggere la cavia da 5 DL_{50} di veleno, occorrevano 0,50 cm³ di siero.

Riteniamo tuttavia, che la differenza di titolo nei sieri immuni prodotti dalle pecore n. 1 e 3, inoculate rispettivamente con omogenati di ghiandole secche e ghiandole fresche, non sia dovuto a questa diversa condizione dell'antigene, bensì ad una diversa sensibilità nella produzione di anticorpi anti-*Latrodectus* da parte degli animali trattati. Inoltre, non si può stabilire definitivamente se vi sia una differenza, nel potere antigenico, tra i cefalotoraci in toto e le ghiandole velenose isolate; difatti il titolo dei due sieri ottenuti con i due metodi, come risulta dalla tav. I e II, è pressochè uguale.

Attualmente presso l'Istituto Superiore di Sanità altre pecore vengono trattate con omogenato di ghiandole di *Latrodectus* per la produzione dell'antisiero per uso umano.

Nel 1955 il nostro siero è stato usato in clinica con ottimi risultati (Bettini e Calcara).

Immunità crociata fra sieri ottenuti con veleno di L. tredecimguttatus e L. hasseltii.

Recenti ricerche hanno dimostrato che alcuni sieri non sono strettamente specifici, ma proteggono anche dal veleno di altre specie dello stesso genere; infatti, il siero anti-*L. indistinctus* protegge dal veleno di *L. concinnus* (Finlayson [8]) ed il siero anti-*L. tredecimguttatus* protegge dal veleno di *L. mactans* (Gajardo-Tobar).

Il nostro siero è stato inviato al Dr. Wiener del Commonwealth Serum Laboratories di Melbourne (Australia) ed è stato titolato verso il veleno di *L. hasseltii;* esso ha dimostrato attività neutralizzante in vitro verso il veleno di *L. hasseltii* maggiore di quella ottenuta con siero specifico.

A nostra volta abbiamo saggiato su cavia il potere antitossico di un siero immune da cavallo anti-*L. hasseltii* gentilmente inviatoci dal Dr. Wiener, ed abbiamo osservato che 0,20 cm³ di tale siero sono necessari per proteggere una cavia del peso di 250-300 g inoculata con 5 DL_{50} di veleno di *L. tredecimguttatus* (omogenato di ghiandole secche), mentre 0,01 cm³ del nostro siero sono sufficienti per proteggere la cavia dalla stessa dose di veleno.

Da ciò risulta che anche fra *L. tredecimguttatus* e *L. hasseltii* esiste una identità antigenica tale da indurre una immunità crociata fra i due sieri antitossici.

Ravaioli L., Cantore G. P. e Bettini S.
Istituto Superiore di Sanità, Roma

BIBLIOGRAFIA

1) Bettini S. e Calcara S., (1956): *Riv. Parass. 17,* 186.
2) Bettini S., Ravaioli L. e Cantore G. P., (1954): *Rend. Ist. Sup. San. 17,* 192.
3) Bogen E., Venoms, A.A.A.S., (1956): p. 101.
4) D'Amour F. E., Becker F. E. e Van Riper W., (1936): *Quart. Rev. Biol. 2,* 123.
5) Gajardo-Tobar R., (1955): *Bol. Chil. Paras. 10,* 2.
6) Finlayson M. H., (1936): *S. Afr. Med. J. 10,* 735.
7) Finlayson M. H., (1936): *S. Afr. Med. J. 10,* 43.
8) Finlayson M. H., (1937): *S. Afr. Med. J. 115,* 163.
9) Finlayson M. H., (1955): *S. Afr. Med. J. 29,* 509.
10) Gray R. M., (1935): *Calif. West. Med. 43,* 328.
11) Maretic Z. e Stanic M., (1954): *Bull. Org. Mond. Santé, 2,* 1007.
12) Stanic M., (1953): *Acta Tropica, 10,* 225.

13) Troise E., (1928): *C.R.S. Biol.* 99, 1434.
14) Vellard J., (1936): Le Venin des Araignées, Masson.
15) Wiener S., (1956): *Med. J. Australia*, 1, 739.
16) Wiener S., (1956): *Med. J. Australia*, 1, 331.

TRASMISSIONE DEL POTERE IMMUNITARIO ANTI-*LATRODECTUS* DALLA MADRE AL FETO

Nel corso dell'immunizzazione di tre pecore verso il veleno del ragno *Latrodectus tredecimguttatus* (*), come descritto in altro lavoro (1), uno di questi animali, ed esattamente quello contrassegnato con il n. 2, partorì due agnelli. Al momento del parto la pecora era stata trattata con quantità progressive di cefalotoraci di *L. tredecimguttatus* omogenizzati in soluzione fisiologica per un totale di 273, ed il siero di tale pecora era capace di proteggere alla dose di 0.01 cm^3 una cavia di 250 g trattata contemporaneamente con 5 DL_{50} (**) di omogenato di ghiandole secche di *L. tredecimguttatus*.

Scopo della nostra ricerca è stato quello di saggiare quali relazioni esistessero tra lo stato immunitario della madre e quello dei nuovi nati.

Gli agnelli (n. 1 e 2 della tabella), fino a 50 giorni dalla nascita, presentavano nel loro siero di sangue anticorpi a titolo elevato verso il veleno di *L. tredecimguttatus*. (vedi tabella). Dato che gli agnelli non avevano mai ricevuto inoculazioni di veleno, nè,

Tabella 1.

*Titolazione del potere immunitario anti-*Latrodectus *del siero di agnelli nati da pecora già immunizzata con omogenato di cefalotoraci di* L. tredecimguttatus.

Agnello	Data della nascita	Data del salasso	cm^3 di siero necessari per proteggere una cavia di 250g da 5 DL_{50} di veleno di *L. trecimguttatus* (1)
(2)			
n. 1	1.6.56	20.7.56	0,5 cm^3
		20.9.56	1,0 cm^3
n. 2		20.11.56	non si ottiene protezione con 1 cm^3
(3)			
		20.7.56	non si ottiene protezione con 2 cm^3
n. 3	28.5.56		
		19.9.56	non si ottiene protezione con 2 cm^3

(1) Per la titolazione del potere anti-*Latrodectus* del siero di ciascun agnello, ad ogni salasso venivano usate 5 cavie di 250 g inoculate, contemporaneamente al siero, con 5 DL_{50} di omogenato di ghiandole secche di *L. tredecimguttatus*.

(2) Agnelli n. 1 e 2 nati dalla pecora immune.

(3) Agnello n. 3 nato da pecora normale ed allattato dalla pecora immune dall'1-6-1956 al 19-6-1956.

(*) Gli esemplari di *L. tredecimguttatus*, da cui è stato ricavato il materiale antigene, provengono dalla zona di Orbetello.

(**) La DL_{50} è stata stabilita con il metodo di Reed e Meunch.

vivendo stabulati, potevano avere avuto contatto con ragni *Latrodectus*, non vi erano dubbi sull'origine materna della loro immunità. Per chiarire eventualmente se l'immunità potesse essere trasmessa per la sola via placentare, o placentare ed alimentare tramite l'allattamento, procedemmo, fin dal giorno seguente il parto, alla sostituzione di uno degli agnelli nato dalla pecora immune con un agnello (n. 3 della tabella) nato nella stessa epoca da altra pecora e privo quindi di anticorpi anti-*Ladrodectus* nel proprio siero di sangue. Tale agnello pur essendosi alimentato per lungo tempo con il latte della pecora immune non ha mai presentato nel proprio siero anticorpi anti-*Latrodectus*.

Tale dato, pur essendo unico e dovendolo quindi considerare con la dovuta cautela, può far supporre che l'immunità sia stata trasmessa dalla madre al feto solo per via placentare, e che tale immunità sia stata determinata in maniera attiva, data la permanenza di essa per lungo tempo e la completa assenza di immunizzazione per via alimentare (latte) come risulta dall'esperienza con l'agnello nato da altra pecora, ma alimentato con lo stesso latte della pecora immune.

CANTORE G. P. e BETTINI S.
Istituto Superiore di Sanità, Roma

BIBLIOGRAFIA

(1) RAVAIOLI L., CANTORE G. P. e BETTINI S. (1957): *Riv. Parass.*, *18*, 202.

INTORNO ALLA PRESUNTA AZIONE ANTIOSSIURIASICA DELLA CORALLINA CORSICA

In un precedente lavoro (1), scrivendo della terapia dell'enterobiasi, si è accennato all'attività curativa della corallina corsica, come indicato in una nota del Prof. IZAR (2).

Questa ricerca ha lo scopo di verificare l'entità di tale azione e di paragonarla a quella di alcuni derivati della piperazina (esaidrato, citrato, adipato). Infatti mentre dalle ricerche compiute da M. RICCI e dallo scrivente (3), come in genere da quelle delle letteratura, è risultato che i derivati della piperazina possono essere considerati come terapia d'elezione dell'enterobiasi, G. IZAR invece così si esprime: « Dopo aver sperimentata la santonina associata o non al calomelano, l'olio di chenopodio puro o sotto forma di ascaridiolo, il timolo, il tetracloruro di carbonio, il tetracloruro di etilene, il busilan, il butolan, l'elminale, l'aloxin, l'esilresorcina, il tanelmin, il violetto di genziana, il cristalvioletto, l'ossichinolinsulfonato di rame, il baguenos, il canturil e la tanto vantata piperazina, sempre abbinati a clisteri di acqua acetica (un cucchiaio da tavola di aceto comune di vino in 200 g. di acqua), l'unico trattamento che ho trovato veramente efficace è stato la somministrazione ripetuta per tre volte a distanza di una settimana di *decotto di muschio di Corsica o corallina di Corsica* (*Alsidium helminthochortos*) g. 15 in latte g. 200, addizionato di manna g. 20. Ma anche al decotto di corallina ho abbinato i clisteri di acqua acetica. Non un sol caso ha dato risultato negativo ».

Notizie farmacologiche sulla corallina corsica.

Secondo quanto gentilmente comunicatomi dal Prof. RENZO BENIGNI, la corallina corsica (sinonimi: Muschio vermifugo, corallina nera) è l'*Alsidium helminthochortos* Kützing, piccola alga della famiglia delle *Rodomeliacee*, che cresce lungo le coste della Corsica, Sardegna, Sicilia.

La droga usata in farmacia è costituita da masse brunastre, composte da numerosi filamenti di varia grossezza, aggrovigliati. Odore speciale caratteristico, sapore salino.

I principali componenti noti sono: una sostanza gelatinosa, una resina bruna, che sembra composta da acido resinolico combinato con un alcaloide; inoltre poco bromo, jodio e tracce di arsenico. Si somministra in forma di infuso, o meglio, di decotto (gr. 5-15: 200 di latte o acqua zuccherata; dose normale per un bambino): o anche in polvere (gr. 2-15 per dose), diluito in sciroppo.

Metodo.

L'indagine è stata effettuata in un asilo nido dell'ONMI (Gaeta). Su 45 bambini, dai 18 m. ai 3 anni, dopo 2 esami col nastro adesivo di cellofan, secondo Graham, ne sono risultati 15 affetti da ossiuriasi. A tutti, per 16 giorni, salvo 2 domeniche, si è dato Corallina Corsica, in due dosi giornaliere, corrispondenti complessivamente a 10-20 gr. in decotto, a seconda che i bambini avessero un peso inferiore o superiore a 12 kg. La corallina è stata sempre ben tollerata.

In soli due soggetti sono stati notati alcuni elementi orticarioidi (non sicuramente attribuibili al decotto), senza che però fosse sospesa la somministrazione.

Per accertare l'effettiva azione curativa della corallina verso *E. vermicularis* non si è creduto opportuno aggiungere, come consigliato da Izar, purganti o clisterini di acqua e aceto.

Tutti i bambini sono stati esaminati ogni 3 giorni dall'inizio del trattamento, fino a 21 giorni dopo, col metodo di Graham. *Per tutti i soggetti è stato possibile ritrovare uova di ossiuri nella quasi totalità degli esami eseguiti* (vedi 1ª prova nella tabella 1).

In seguito a tali risultati, si è ripetutata la prova, usando l'*estratto fluido* (prodotto da una nota ditta specializzata in preparati da piante medicinali) anzichè il decotto. L'estratto fluido è stato somministrato giornalmente alla dose di 3-8-15 gr. (dopo aver diviso i bambini in 3 gruppi di 5 soggetti), diluiti in sciroppo di lamponi. Il trattamento è stato protratto per 15 giorni.

Dai controlli eseguiti come per la prima prova, è risultato che non si è ottenuta la disinfestazione in nessun bambino.

Tabella 1.

Trattamento dell'entorobiasi con Corallina Corsica.

Tipo trattamento x die x 15 gg.	N. bambini trattati	Controllati completam.	Non guariti	Guariti
1ª PROVA 10 gr. in decotto	8	7	7	—
20 gr. in decotto	7	6	6	—
TOTALI	15	13	13	—
2ª PROVA 3 gr. estratto fluido	5	4	4	—
8 » » »	5	5	5	—
15 » » »	5	5	5	—
TOTALI	15	14	14	—

Conclusione.

In 15 bambini, di età compresa fra i 18 m. e i 3 a., affetti da enterobiasi, la corallina corsica, somministrata sia sotto forma di decotto che di estratto fluido, è stata ben tollerata senza dimostrare alcun effetto terapeutico specifico, sebbene la somministrazione sia stata praticata a dosi generose e per un tempo sufficientemente lungo.

Probabilmente l'aggiunta di altri sussidi terapeutici (come purganti e clisterini di acqua e aceto, consigliati da IZAR) avrebbe potuto mutare i risultati ottenuti. Poichè scopo della ricerca era soprattutto l'accertamento dell'attività intrinseca della corallina corsica, non è sembrato ragionevole ricorrere ad associazioni, che avrebbero reso difficile l'interpretazione dei risultati.

Al momento attuale i prodotti di elezione nella terapia dell'enterobiasi devono essere scelti tra i derivati della piperazina. Tra questi l'esaidrato, il citrato e più ancora l'adipato possono dare guarigioni controllate dell'85-95% dei trattati (3-5).

SALVATORE CORBO

Federazione Provinciale O.N.M.I., Latina

BIBLIOGRAFIA

1) CORBO S. (1956): Il problema dell'enterobiasi nel bambino. *Arch. ital. Ped. e Puer.*, *XVIII*, 106.
2) IZAR G. (1955): Le parassitosi intestinali. Oxiuriasi. *Relaz. Clin. Scient.*, *41*, 6.
3) RICCI M., CORBO S. (1955): Sull'azione dell'idrato di piperazina verso *Enterobius vermicularis*. *Riv. Parass.*, *16*, 73.
4) BENIGNI R.: Comunicazione personale.
5) RICCI M., CORBO S. (1956): Sull'azione dell'adipato di piperazina verso *Enterobius vermicularis* e *A. lumbricoides*. *Riv. di Parass.*, *17*, 97.

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DELLA DIFFUSIONE DELLE ELMINTIASI INTESTINALI NELLA POPOLAZIONE INFANTILE DI ROMA

Scopo originario del presente lavoro era di effettuare una comparazione tra le condizioni del parassitismo da elminti intestinali — indagate a mezzo di esame delle feci, diretto e dopo arricchimento con soluzione cloruro sodica satura, e di applicazione del nastro di cellofan adesivo con il metodo di Graham per la ricerca particolare di *Enterobius vermicularis* — in due popolazioni infantili viventi in condizioni di ambiente generale alquanto differenti: una era infatti costituita dai bambini della Scuola Elementare « Fratelli Bandiera », e annesso Asilo d'infanzia, sita nel quartiere Italia, bambini in grande prevalenza appartenenti al ceto medio (professionisti, impiegati, ecc.); l'altra era data esclusivamente da bambini appartenenti a famiglie assai modeste, viventi alla periferia del quartiere Portonaccio in rudimentali baracche di legno e quindi in piuttosto precarie condizioni d'igiene generale.

Per difficoltà varie, tra cui principalmente l'assai scarsa collaborazione data alla ricerca da parte dei genitori dei soggetti, tale scopo non si è potuto pienamente raggiungere in quanto: 1, nei confronti dell'indagine con il nastro di cellofan adesivo il materiale raccolto presenta tra i due gruppi una eccessiva eterogeneità nella distribuzione dei soggetti per età, e non consente pertanto, tenute presenti le notevoli variazioni nella diffusione della enterobiasi in relazione all'età che sono state messe in evidenza da vari Autori, una obbiettiva comparazione; e 2, i campioni di feci si sono potuti ottenere soltanto da uno dei due gruppi. Ci si limiterà quindi a riferire semplicemente i dati raccolti, nel loro complesso, onde contribuiscano alla miglior conoscenza della diffusione delle elmintiasi intestinali tra i bambini di Roma; la scarsità dei dati in materia induce infatti a ritenere non inutile la citazione di essi.

Sono stati esaminati con il nastro di cellofan adesivo 306 bambini, 130 maschi e 176 femmine, tra 1 e 12 anni di età. La composizione del gruppo per età è indicata nel seguente specchietto (maschi e femmine vengono sia qui che in seguito considerati unitamente poichè non sono emerse differenze apprezzabili nel comportamento dei due sessi verso le elmintiasi):

anni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n.	2	14	11	20	55	146	22	16	6	10	2	2

Sono risultati positivi per *E. vermicularis* 75 soggetti, pari al 24,51% (maschi: 25,38%; femmine: 23,86%). Raccogliendo i soggetti in classi di età di 3 anni, pur tenendo nella giusta considerazione l'influenza sul valore percentuale della ben diversa consistenza numerica delle varie classi, si nota anche qui la tendenza all'aumento della diffusione della parassitosi con l'avanzare dell'età; si ha infatti: per i 27 soggetti di 1-3 a. l'11,11%; per i 221 di 4-6 a. il 24,43%; per i 44 di 7-9 a. il 27,27%; per i 14 di 10-12 a. il 42,86%.

I campioni di feci esaminati, tutti di soggetti appartenenti al secondo gruppo, ammontano a 61; 22 di essi, pari al 36,06% sono stati positivi per uova di elminti. Sono state repertate, nelle percentuali a fianco indicate, le seguenti specie: *Hymenolepis nana* (14,75%), *Enterobius vermicularis* (1,64%), *Ascaris lumbricoides* (3,28%), *Trichuris trichiura* (24,59%). 4 soggetti, pari al 18,18% dei parassitati, hanno presentato casi di associazione di due parassiti: *H.n* + *T.t.* 2, *A.l.* + *T.t.* 1 e *E.v.* + *T.t.* 1. Considerando anche i risultati dell'esame con il nastro di cellofan adesivo il numero delle associazioni di due parassiti sale a 6: *H.n.* + *T.t.* 1, *A.l.* + *T.t.* 1, *E.v.* + *T.t.* 4, e se ne ha anche 1 a tre parassiti: *H.n.* + *E.v.* + *T.t.*

Piero Capone - Braga

Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia, Roma

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVIII - N. 3 - Luglio 1957

RECENSIONI

Edney E. B. - *The Water Relations of Terrestrial Arthropods*. 109 pp., 32 figg. Cambridge Monographs in Experimental Biology, 5, Cambridge University Press, 1957, $ 15.

Il libro tratta della fisiologia dell'equilibrio idrico negli insetti. L'autore, che negli ultimi anni si è occupato intensamente di questo problema, è uno degli studiosi più qualificati a trattarlo con competenza. Dopo una breve introduzione in cui vengono discusse le leggi generali che regolano l'equilibrio idrico, l'autore divide la materia in 4 capitoli principali: la traspirazione in rapporto alla struttura cuticolare; l'escrezione e l'osmoregolazione; l'introduzione dell'acqua nell'insetto; e l'acqua in rapporto con la temperatura corporea. Chiude il volumetto un capitolo conclusivo che riassume chiaramente le teorie già esposte. Una estesa bibliografia completa l'opera. La biblioteca del fisiologo degli insetti e dell'ecologo si arricchiscono così di un volumetto di pregio, qualità che già abbiamo riscontrato nelle opere precedenti edite dalla Cambridge University Press e facenti parte della serie di monografie sulla biologia sperimentale.

S. Bettini

Cameron T. W. M. - *Parasites and parasitism*. XIX + 322 pp., 115 figg. Methuen & Co. Ltd., London e J. Wiley & Sons. Inc., New York, 1956, Sh. 35.

In questo libro il fenomeno parassitario viene considerato nel suo più puro aspetto biologico: il parassita è un essere vivente che almeno in un momento del suo ciclo vitale ha ineluttabile necessità, per sopperire al suo fabbisogno nutrizionale, di appoggiarsi ad un altro essere vivente, l'ospite. Il concetto della patogenicità, possibile ma non necessaria, deve esulare dalla definizione del parassita: esso è un «simbionte», con rapporti di volta in volta variabili con il suo ospite, ma che nella grandissima maggioranza dei casi ha raggiunto con questo un reciproco adattamento.

Su questi capisaldi è imperniata tutta la struttura del libro che consta, oltre che di una *Introduzione* con brevi cenni di carattere generale, di due parti: *I parassiti* e *L'ospite e le sue reazioni*.

Nella prima parte si fa la conoscenza dei parassiti: con trattazioni brevi, ma complete in tutti gli aspetti essenziali, sono passati in rassegna i vari gruppi sistematici di interesse parassitario ripartiti nelle tre sezioni dei *Protisti*: Batteri, Funghi, Spirochete, Protozoi, Virus e Rickettsie; dei *Più bassi Metazoi*: Celenterati ed Elminti; dei *Più alti Metazoi*: Anellidi, Artropodi, Molluschi, Vertebrati.

Nella seconda parte, in distinti capitoli, si tratta dell'ospite e delle sue reazioni, del parassitismo, delle malattie infettive, dei fattori determinanti la distribuzione dei parassiti, dei principi informatori della lotta contro i parassiti e le malattie parassitarie, della specificità parassitaria e dell'evoluzione dei parassiti. E' certo questa la parte più interessante del volume sia per il completo quadro che degli aspetti generali

lunga esperienza nella materia, ha dato alla trattazione in essa anche condensando alcune opinioni — in quanto tali non da tutti forse accettabili — in lui maturate quale frutto della sua intensa attività di parassitologo.

Una bibliografia commentata, la classificazione dei parassiti ricordati nel testo ed un indice glossario completano quest'opera la cui lettura sarà certo piacevole per ogni cultore della parassitologia, e soprattutto di grandissima utilità per chi appassionato di questa scienza, muove in essa i primi passi.

Bella la veste editoriale e buone le numerose illustrazioni, tutte date da disegni per la maggior parte originali.

M. Ricci

Mariani M. - *Compendio di Entomologia Medica*, 2 ed.. 330 pp., XXX tavv., 20 figg.. G. Mori, Palermo, 1956.

Dobbiamo compiacerci con l'A. per questa seconda edizione del Compendio di Entomologia Medica che, apparso per la prima volta nel 1952, fu subito accolto con favore nell'ambiente entomologico e specialmente medico igienistico italiano. L'opera appare ora migliorata nella sua veste tipografica e nel contenuto, mediante un accurato lavoro di revisione e di aggiornamento, ma rimane invariata nelle sue grandi linee. Torna qui opportuno ricordare che essa è tuttora l'unica del genere in Italia e che, anche per lo sviluppo che l'A. ha voluto dare alla parte pratica, la sua consultazione torna di grande utilità a qualunque medico-igienista che desideri raccogliere notizie di interesse pratico su qualunque argomento di Entomologia Medica.

G. Saccà

Babic I., Delak M. e Mikacic D. - Nametnici i nametnicke bolesti domace peradi (*Parassiti e malattie parassitarie del pollo domestico*). 348 pp., 147 figg.. Jugoslavenska Akademija, Zagreb 1956.

Seguendo lo stesso schema usato nelle precedenti analoghe opere sui parassiti e malattie parassitarie del suino (1943) e del cavallo (1953) — v. per quest'ultimo questa Rivista, Vol. XV, p. 64 — gli AA., dopo una parte introduttiva generale illustrano in questo libro parassiti e malattie parassitarie del pollo. Anche qui si ha una fornita bibliografia in calce ad ogni argomento. Come per le precedenti opere deve purtroppo esprimersi il rammarico che la qualità della carta usata renda spesso ben poco nitida l'iconografia, altrimenti ricca ed oculatamente scelta.

M. Ricci

Libri ricevuti

Setti C. - *Trattato di parassitologia veterinaria*. 2a ed., 2 voll. litografiati, 1540 pp., 369 figg. Edizioni Universitarie Bargellini, Modena, 1957.

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22